

И.А. БАКУЛОВ
В.А. ГАВРИЛОВ
В.В. СЕЛИВЕРСТОВ

СИБИРСКАЯ ЯЗВА (АНТРАКС)

НОВЫЕ СТРАНИЦЫ
В ИЗУЧЕНИИ "СТАРОЙ" БОЛЕЗНИ

БАКУЛОВ Н.А. ГАР

СИБ

(А

НОВЫЕ СТ

"СТ

ВО


БАКУЛОВ И.А., ГАВРИЛОВ В.А., СЕЛИВЕРСТОВ В.В.

СИБИРСКАЯ ЯЗВА

(АНТРАКС):

НОВЫЕ СТРАНИЦЫ В ИЗУЧЕНИИ
“СТАРОЙ” БОЛЕЗНИ

ВОЛЬГИНСКИЙ, 2000


ИЗДАТЕЛЬСТВО
— лосос —
ВЛАДИМИР
2001

УДК 616.981.51

ББК П 873.2

.Б 19

СНЕРСКА

РЗА

(АНТРАКС)

НОВЕ СТРАНИЦИ В ИСТОРИЈА
"СТАРОЈ БОЛЕСТИ"

ISBN 5-86953 - 032 - 6

© Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В., 2000 г.

© Издательство "Посад", 2001 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	4
1. ВВЕДЕНИЕ	5
2. ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ТЕЧЕНИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА) ЖИВОТНЫХ И ЛЮДЕЙ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ	8
2.1. Распространенность (география) сибирской язвы (антракса). Современная эпизоотическая ситуация	8
2.2. Особенности эпизоотологии и эпидемиологии сибирской язвы (антракса) в мире и, в частности, в России в современных условиях	70
Восприимчивые животные (75). Источники возбудителя инфекции и факторы его передачи (80). Стационарность сибирской язвы (антракса) (82). Периодичность (повторяемость) вспышек сибирской язвы (антракса). Сезонность болезни (83). Характеристика эпизоотического процесса сибирской язвы (антракса) в современных условиях (84).	
3. BAC.ANTHRACIS – ВОЗБУДИТЕЛЬ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЖИВОТНЫХ И ЛЮДЕЙ	85
3.1. Классификация и таксономия	85
3.2. Морфология	87
3.3. Изучение сибиреязвенного (антракс) токсина	94
Биохимическая характеристика сибиреязвенного (антракс) токсина (96). Молекулярно-генетическая характеристика сибиреязвенного (антракс) токсина (97). Механизм действия сибиреязвенного (антракс) токсина (102)	
4. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ И ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ	121
5. НОВЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА) И ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БОЛЕЗНИ	129
6. НОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА) У ЖИВОТНЫХ И ЛЮДЕЙ	162
7. ВОПРОСЫ ИММУНОЛОГИИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА), НОВЫЕ СРЕДСТВА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ	173

4	8. НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА	
5	И ПРИМЕНЕНИЯ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ	
	ПРОФИЛАКТИКИ	202
	8.1. Особенности культивирования сибиреязвенных	
	вакцинных штаммов	202
	8.2. Использование суспензионного культивирования	
	для получения спорового вакцинного материала	213
8	8.3. Концентрирование спор вакцинного	
	сибиреязвенного штамма	216
8	8.4. Усовершенствованные методы контроля спорового	
	вакцинного материала	221
	8.5. Иммунобиологические свойства сибиреязвенной	
	вакцины, изготовленной суспензионным способом .	225
70	8.6. Групповое применение сибиреязвенной вакцины	229
	9. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ	
	ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ И ВЫНУЖДЕННЫХ	
	(ПРОТИВОЭПИЗООТИЧЕСКИХ	
	И ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ) МЕРОПРИЯТИЙ	235
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .	256
	ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	278

85
85
87
94

121

129

162

173

Наука не является и никогда не будет закон-
ченной книгой. Каждый важный успех приносит
новые вопросы. Всякое развитие обнаруживает
со временем все новые и более глубокие трудно-
сти.

(А.Эйнштейн, немецкий физик, 1879 - 1955 гг.)

ПРЕДИСЛОВИЕ

На полках книжных магазинов редко можно обнаружить новую литературу по сибирской язве (антраксу). В периодической печати также скудно представлена эта тема. Особенно трудно стало ознакомиться с тем, что публикуют в иностранных журналах. Есть, конечно, Интернет, но он доступен далеко не всем.

Поэтому представляют большой интерес материалы проводимых за рубежом Международных симпозиумов по антраксу, которые состоялись в 1989, 1995 и 1998 годах. В них содержатся самые современные данные о распространенности сибирской язвы (антракса) в мире и отдельных странах; описаны эпизоотологические и экологические аспекты этой болезни, новейшие данные по изучению возбудителя сибирской язвы; приведены результаты исследований по диагностике болезни, разработке средств специфической профилактики и совершенствованию системы профилактики и борьбы с сибирской язвой людей и животных.

Небольшой, но достаточно квалифицированный авторский коллектив (И.А.Бакулов, В.А.Гаврилов, В.В.Селиверстов) взялся перевести на русский язык, проанализировать и систематизировать эти материалы, дополнив их новыми данными, полученными российскими исследователями. Это связано с тем, что за рубежом плохо знакомы с книгами и статьями по этой проблеме, изданными в нашей стране.

Ознакомившись с предлагаемой книгой, читатель может представить себе эпизоотическую и эпидемическую ситуации по сибирской язве (антраксу) и получить современные сведения о достижениях науки в изучении этой болезни.

Книга предназначена для ветеринарных и медицинских специалистов, биологов, студентов вузов.

1. ВВЕДЕНИЕ

Что такое сибирская язва (антракс), в наше время знает, пожалуй, не только каждый врач, но и большинство простых граждан. Болезнь известна с древности. Однако широко используемые ссылки на древнегреческих авторов требуют уточнения. Так, R. Pfisterer (цит. по Proc. Inter. Work. shop, Winchester, 1996) сообщает, что «в каждом историческом обзоре, опубликованном по сибирской язве (антраксу), говорится, что слово «антракс» использовали Гомер и Гиппократ в упоминании о болезни. Тщательное изучение оригинальных текстов показывает, что Гомер не употреблял слово «антракс» при ссылке на болезнь. Это слово можно найти только один раз в его произведении «Илиада» и оно означает «горящие угли». В текстах Гиппократа «антракс» также означает, за небольшими исключениями, «горящие угли». В некоторых из этих текстов «антракс» определяет различные неспецифические везикулярные или «прыщавые» дерматиты без каких-либо показаний на контакт с больными животными. Дифференциация между «доброкачественным и злокачественным антраксом» сделана много позже».

Период активного изучения сибирской язвы (антракса) насчитывает уже около 200 лет. Исследования проводились во многих странах и в многочисленных исследовательских институтах и лабораториях. История изучения болезни пестрит громкими именами — Л. Пастер, Р. Кох, Л. С. Ценковский, Ф. А. Брауэль, Н. А. Михин, Ф. А. Терентьев, С. Г. Колесов, Я. Е. Коляков и многие другие. Казалось бы, что все связанное с сибирской язвой (антраксом) изучено досконально: описаны возбудитель, эпидемиология и эпизоотология болезни, разработана диагностика, созданы эффективные вакцины, научились лечить больных людей и животных.

Однако научная мысль постоянно возвращается к этому интересному объекту, продолжая открывать новые стороны этой «старой» болезни. Практические специалисты, которые сталкиваются с сибирской язвой в ходе своей деятельности, также задают вопросы, т.к. видят определенные явления, требующие объяснения, доработки некоторых инструктивных положений, дополнительного изучения на новой, более современной и совершенной научной основе.

Кстати, и сама болезнь — сибирская язва (антракс) не столь уж редко встречается в наше просвещенное время. Не эпидемиями и

эпизоотиями, которые стали редкостью, но отдельными случаями и вспышками часто напоминает о себе. Мировая и отечественная статистика показывают, что в большинстве стран мира и сейчас регистрируют случаи сибирской язвы. А раз есть случаи, то существует потенциальная угроза повторения. Таков уж этот микроорганизм — *Bac. anthracis*. Он может во внешней среде десятилетиями ждать своего часа, сохраняя при этом болезнетворность. Следовательно, в каждой стране необходимо иметь налаженную высоко специфичную и быструю диагностику и надежные средства защиты (вакцины, сыворотки, глобулины, антибиотики), а также людей — специалистов, постоянно работающих над этой проблемой и готовых в любую минуту осуществить необходимый комплекс диагностических и защитных мероприятий.

В чем мы ощущаем неполноценность своих знаний о сибирской язве, что нам надо еще изучить, какие темные места высветить, что изобрести или разработать?

Требуется глубокое изучение возбудителя сибирской язвы с использованием новейших методов молекулярной биологии, генетики и генной инженерии. Это позволит: разобраться в многообразии штаммов возбудителя болезни, выделенных из разных объектов (человек, животные, внешняя среда) и в различных регионах; установить наличие вариантов этого микроорганизма, убедиться или опровергнуть мнение об их генетических и антигенных различиях; выявить характерные отличия штаммов (если таковые обнаружатся), выделенных на разных территориях, что позволит проследить пути миграции, эволюционные изменения; получить маркированные штаммы.

Предстоит до конца разобраться с большой группой микроорганизмов, близких по своим основным свойствам возбудителю сибирской язвы, начиная с такого своеобразного микроорганизма, каким является *Bac. cereus*. Это позволит более надежно осуществлять дифференциальную диагностику при проведении идентификации сибиреязвенного микроба.

В ходе дальнейших исследований должна стать ясной роль бактерий, обладающих всеми свойствами сибиреязвенного микроба, но лишенных патогенности, а также капсулы и, соответственно, плазмиды, кодирующей это свойство. Эти бескапсульные микроорганизмы циркулируют в организме животных. Бактериологи сталкиваются с ними в ходе исследований патологического материала от больных и павших животных, однако должного толкования причин их появления с эволюционной точки зрения и роли их в эпизоотическом

процессе сибирской язвы
время среди них есть
генностью и способно
сибирской язвой.

Углубленное изучение
характеристик и других свойств
кой язвы даст возможность
ные фрагменты (субстраты)
алов для создания вакцин
тных, инактивированных

Обстоятельного изучения
ной инфекции. Результаты
для рационализации
прививок, разработки
вотных с использованием
исследования.

В частности, требуется
прививок взрослого населения
гополучных по сибирской
мальные дозы вакцин
кратность инъекций.

Актуальна также работа
ных к сибирской язве
прививок диких животных
ках, питомниках, зоопарках

Использование новейших
нальные антитела, ЕЛ
ДНК-гибридизация, Г-
др.) позволит усовершенствовать

Требуются исследования
филактики и борьбы с
целью выработки вакцин
с этой опасной болезнью

Это далеко не полный
ния. На некоторые вопросы
ему книге.

Эта книга включена
туре по сибирской язве
следований отечественных
ляются авторами этой
Авторы с благодарностью
свой адрес.

процессе сибирской язвы пока никто еще дать не может. В то же время среди них есть штаммы, обладающие выраженной иммуногенностью и способностью предохранять животных от заражения сибирской язвой.

Углубленное изучение строения, физиологии, антигенных характеристик и других свойств микробной клетки возбудителя сибирской язвы даст возможность более обоснованно использовать отдельные фрагменты (субстанции) микробной клетки в качестве материалов для создания высокоиммуногенных и безвредных (компонентных, инактивированных) вакцин.

Обстоятельного изучения ждет и патоиммуногенез сибиреязвенной инфекции. Результаты этих исследований будут использованы для рационализации системы профилактических и вынужденных прививок, разработки надежной оценки иммунитета у привитых животных с использованием серологических и аллергических методов исследования.

В частности, требует пересмотра схема ежегодных повторных прививок взрослого крупного рогатого скота в стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктах. Требуется подобрать оптимальные дозы вакцин в зависимости от их характеристик, уточнить кратность инъекций.

Актуальна также проблема прививок таких высокочувствительных к сибирской язве животных, каковыми являются козы, а также прививок диких животных в живой природе, в национальных парках, питомниках, зоопарках.

Использование новейших иммунологических методов (моноклональные антитела, ELISA, ИФА и др.) и генетических методов (ДНК-ДНК гибридизация, ПЦР, рестрикционный и плазмидный анализы и др.) позволит усовершенствовать диагностику сибирской язвы.

Требуется исследование по сравнительному изучению опыта профилактики и борьбы с сибирской язвой в различных странах с целью выработки наиболее рациональной тактики и стратегии борьбы с этой опасной болезнью.

Это далеко не полный перечень вопросов, требующих разрешения. На некоторые из них читатель найдет ответы в предлагаемой ему книге.

Эта книга включает данные, опубликованные в мировой литературе по сибирской язве за последние годы, а также результаты исследований отечественных специалистов, некоторые из которых являются авторами этой книги.

Авторы с благодарностью учтут все пожелания и замечания в свой адрес.

2. ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ТЕЧЕНИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА) ЖИВОТНЫХ И ЛЮДЕЙ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

2.1. Распространенность (география) сибирской язвы (антракса). Современная эпизоотическая ситуация

Сибирская язва (антракс) – уникальная инфекционная болезнь животных и человека. Раз возникнув в какой-либо местности, она может укореняться, сохраняя на многие десятилетия угрозу повторных вспышек.

Современная статистика регистрирует новые (свежие) очаги болезни в ранее благополучной местности или «ожившие» по тем или иным причинам (земляные работы, водная или ветровая эрозия, наводнение, землетрясение и т.п.) старые очаги в стационарно неблагополучной местности. Зарегистрированные ранее очаги, которые не проявляют в данный момент активности, текущей статистикой не учитываются. Сведения о них можно получить из сибиреязвенных кадастров, отчетов, эпизоотических журналов и эпизоотических карт, публикаций. Однако эти места гибели животных или захоронения сибиреязвенных трупов остаются потенциально опасными.

Ветеринарно-санитарными правилами, утвержденными в РФ в 1996 году, при организации противосибиреязвенных мероприятий следует различать эпизоотический очаг, стационарно неблагополучный пункт, почвенный очаг и угрожаемую по этой болезни территорию. Поэтому применительно к сибирской язве должны учитываться и новые (свежие), и ранее установленные потенциально опасные очаги.

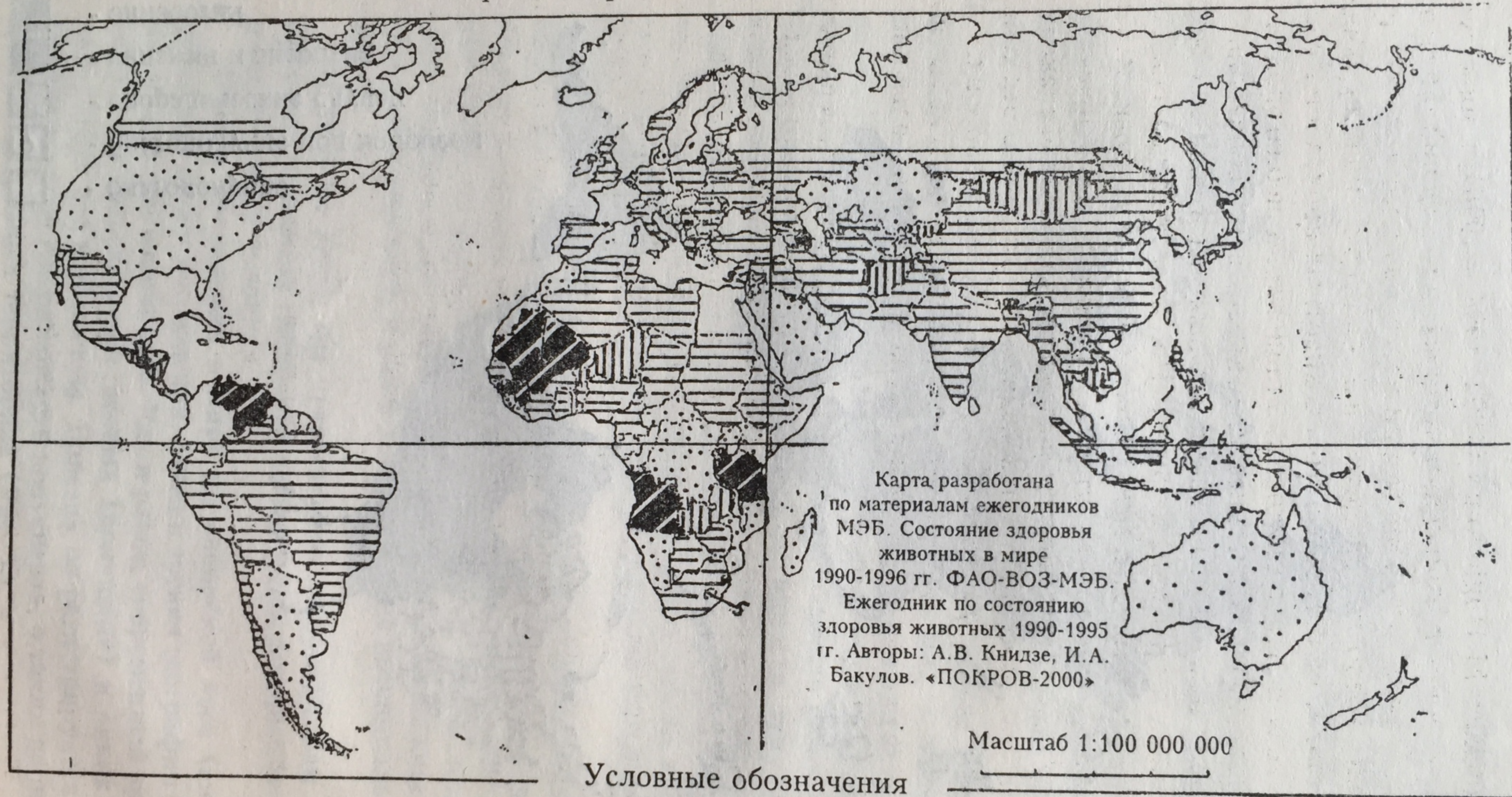
Исходя из этого, мы представляем доступные нам сведения о прошлых вспышках сибирской язвы и о тех, которые беспокоят нас в современных условиях.

Общая обстановка в мире по сибирской язве (антраксу) за последние 30 лет наблюдения, с точки зрения географии этой болезни, мало в чем изменилась. Как и ранее, современный ареал сибирской язвы сельскохозяйственных (домашних) и диких животных охватывает все континенты. Болезнь не регистрируется только на крайнем севере Американского континента, а также на немногочисленных островных территориях (Рис. 1).

Рис. 1. Глобальная ситуация по антраксу домашних животных в 1994 г. (М.Е. Hugh-Jones, 1996)



Рис. 2. Антракс в странах мира (1990 - 1996 гг.)



Не зарегистрирована

Болезнь регистрируется, но число случаев не указывается

Напряженность ситуации средняя (инцидентность 11-30 случаев на 1 млн. голов с.-х. животных)

Умеренно превышает средний уровень (инцидентность 31-50 случаев на 1 млн. голов с.-х. животных)

Ситуация существенно превышает средний уровень (инцидентность более 51 случая на 1 млн. голов с.-х. животных)

Напряженность ситуации ниже средней (инцидентность 1-10 случаев на 1 млн. голов с.-х. животных)

Как сообщает М. Hugh-Jones (1993, 1994 и 1996), в мире существуют территории, в отношении которых нет сведений о благополучии по антраксу; есть территории благополучные и территории, благополучие которых находится под вопросом; имеются обширные территории, на которых антракс животных проявляется sporadически; существуют территории, стационарно неблагополучные (эндемические и энзоотические) и, наконец, есть территории, где антракс животных и в наше время проявляется в виде эпизоотий. Все эти градации отражены на рис. 1. На рис. 2 представлена карта распространения антракса в 1990-1996 гг. (авторы А.В. Клизе, И.А. Бакулов), которая дополняет и уточняет данные М. Hugh-Jones.

Таким образом, уровень заболеваемости животных антраксом и, стало быть, напряженность эпизоотической ситуации в отдельных частях мирового ареала этой болезни далеко не равномерны. На Африканский, Азиатский и Южно-Американский континенты приходится большая часть мирового числа вспышек и большинство отдельных случаев антракса.

Здесь надо упомянуть о несовершенстве учета заболеваемости животных инфекционными болезнями, осуществляемого международными организациями – Международным эпизоотическим бюро (МЭБ) и Комиссией по продовольствию и сельскому хозяйству при ООН (ФАО). Дело в том, что МЭБ регистрирует вспышки болезни, т.е. «одновременное заболевание нескольких животных в хозяйстве», а ФАО – случаи, т.е. «заболевание одного животного» (И.А. Бакулов и соавт., 1986). Поэтому приводимые данные не совпадают, их трудно оценивать, на что справедливо указывает М. Hugh-Jones (1996), причем расхождения, по его подсчетам, составляют от 10 до 20%.

Наиболее напряженная эпизоотическая ситуация по антраксу животных в Европейских странах Средиземноморья – Греции, Италии, Испании, Албании, Румынии; в Центральной и Южной Америке – Гватемале, Гондурасе, Чили, Гаити, Перу; в Северной Америке – Канаде и США (спорадические случаи); в Африке – в западной и центральной частях; в Азии – в центральной и южной ее частях (Сирия, Индия, Шри-Ланка, Таиланд, Турция); есть сообщения о вспышках антракса в Австралии.

Статистику заболеваемости людей антраксом нельзя назвать полноценной, однако некоторые данные можно привести.

В 1970-1990 гг. в Африке заболеваемость людей характеризовалась следующими цифрами (Т. Fujikura, ВОЗ, 1989): Буркина Фасо (497 в 1977 г.), Египет (2043 в 1979 г.), Кения (327 в 1976 г.), Мали

(152 в 1978 и 121 в 1980 гг.); Руанда (300 в 1980 и 249 в 1981 гг.), Сенегал (150 в 1981 г.), Судан (1362 в 1981 г.).

В Азии – Иран (200 в 1978, 391 в 1980 и 182 в 1981 гг.), Ирак (200-269 ежегодно в 1976-1980 гг.), Таиланд (116 в 1981 и 251 в 1982 гг.), Турция (305 в 1976 г.), Вьетнам (107 в 1978 г.).

В Европе – Испания (216-315 ежегодно в 1976-1982 гг.).

Хотя статистический учет случаев и вспышек болезни в Европе и на других континентах ведется не на одинаковом уровне (в Африке и Азии регистрация далеко не полная), географическое распространение антракса у животных в основном коррелирует с показателями по заболеваемости людей.

В плане мирового распространения антракса большое значение имеет видовой состав болеющих животных. В Западном полушарии, в Европе, Африке и на западе Азии – это в основном рогатый скот, на востоке Азии – свиньи.

Таким образом, оптимум мирового ареала антракса приурочен в настоящее время к Западной и Центральной Африке, Центральной и Южной Азии, Южной Америке, к Средиземноморью – в Европе.

Такова глобальная эпизоотическая ситуация по антраксу.

Приводим некоторые подробности по континентам.

АВСТРАЛИЯ

Сибирская язва (антракс) была завезена в Австралию в 1847 году и впервые зарегистрирована в Кемберленде (Новый Южный Уэльс), за что получила название кемберлендской. Затем она появилась за Голубыми горами, а по мере расширения зоны разведения скота – и в других районах Австралии.

В прошлом антракс регистрировали в основном в двух штатах: в Новом Южном Уэльсе и Виктории, причем зона проявления заболевания была ограничена 34 и 36° южной широты и 146 и 148° восточной долготы.

Болели все виды животных, но чаще всего овцы. Подавляющее большинство случаев возникновения болезни было связано с пастбищным содержанием овец и крупного рогатого скота, особенно в районах засушливых полупустынь. Животные с пылью и частицами почвы заглатывают споры возбудителя антракса, а поедание сухих стеблей растений, ранящих слизистую рта и пищевода, способствует развитию инфекции.

Больше всего случаев антракса отмечено в Новом Южном Уэльсе: с 1936 по 1937 гг. заболело 149909 овец, 2069 голов крупного рогатого скота и 346 лошадей; из них пало овец 2261, крупного рогатого

Годы	Число вспышек
1949-1950	10
1950-1951	2
1951-1952	7

Число зарп
из года в год
другими мате
1962 по 1967 г
г. – 33; 1964 г
Сезонные к
ли тесно связ
мом осадков п
ются: на север
целом по конт
ти приходится
шарий (И.А.Ба
Антракс в
поголовья и о
большой опас
зарегистриров
пишут авторы
R. Rubina, 1998
вере Централь
еще в 82 хозяй
са 202 головы
подтверждено
случаев, в 8 х
антракса. Пик
(26.01. – 02

скота 33 и лошадей 107. Во время десяти вспышек в 1938 г. заболело 9543 овцы, 6481 голова крупного рогатого скота и 107 лошадей, из которых пало соответственно 595, 75 и 19.

Таблица 1.
*Заболеваемость и смертность
животных Австралии от антракса в 1949–1952 гг.*

Годы	Число вспышек	Заболело			Пало			Смертность (%)		
		овец	КРС	свиней	овец	КРС	свиней	овец	КРС	свиней
1949-1950	10	9339	2593	-	218	21	-	2,31	0,8	-
1950-1951	2	2127	77	-	241	4	-	11,3	5,2	-
1951-1952	7	1837 1	324	56	434	4	5	2,3	1,2	8,9

Число зарегистрированных случаев (вспышек) на континенте из года в год не имеет значительных колебаний и по сравнению с другими материками находится на относительно низком уровне. С 1962 по 1967 г. всего наблюдалось 173 вспышки: 1962 г. – 29; 1963 г. – 33; 1964 г. – 26; 1965 г. – 33; 1966 г. – 23; 1967 г. – 29.

Сезонные колебания уровня заболеваемости антракса в Австралии тесно связаны с климатическими факторами. Вслед за минимумом осадков периоды максимального подъема антракса регистрируются: на севере страны в апреле; на юге и юго-востоке в декабре. В целом по континенту относительно высокий уровень заболеваемости приходится на зимние месяцы, самые теплые для южных полушарий (И.А.Бакулов, М.Г.Таршис, 1971).

Антракс в Австралии в условиях широкой иммунизации поголовья и ограниченного ареала, казалось бы, не представляет большой опасности для животноводства, однако в 1997 году была зарегистрирована эпизоотия антракса «взрывного» характера, как пишут авторы (M. Hugh-Jones, 1998; A. Turner, I. Galvin, G. Miller, R. Rubira, 1998). Болезнь была диагностирована в хозяйстве на севере Центральной Виктории 26.01.1997 г., затем в течение 7 недель еще в 82 хозяйствах. В период с 26.01. по 26.03. погибли от антракса 202 головы крупного рогатого скота и 4 овцы. В 49 хозяйствах подтверждено только по одному случаю, в 26 хозяйствах – от 2 до 4 случаев, в 8 хозяйствах было 5 и более подтвержденных случаев антракса. Пик смертности был зарегистрирован с 1 по 5 неделю (26.01. – 02.03.), когда погибли 13, 40, 63, 44 и 23 головы.

Во вторую неделю вспышки была применена поголовная вакцинация – привито 78649 голов крупного рогатого скота и 2663 овцы на 457 фермах в начале марта. Между 26.03.97 г. и 03.05.97 г. болезнь была обнаружена дополнительно только в одном хозяйстве у 28 голов крупного рогатого скота и одной лошади, причем 14 голов крупного рогатого скота и лошадь не были вакцинированы.

Там, где была диагностирована сибирская язва в 1997 году, болезнь не регистрировали с 1914 года, однако в 40 км к востоку в 50-60-70-х годах вспышки антракса имели место.

Вспышка 1997 года находилась на территории большой северной административной дороги, по которой перегоняли скот в прошлом столетии и наблюдали вспышки болезни, получившей широкое распространение в 1890 году. Эти вспышки антракса на севере Центральной Виктории были сходны с таковыми в Техасе и Луизиане (США), где также возникала болезнь на старых скотопрогонных трассах.

В **ОКЕАНИИ** антракс впервые установили в 1895 году, когда болезнь, по некоторым данным, была завезена из Индии и Австралии с костной мукой. Максимальное распространение она получила в 1902-1903 гг. За последующие 30 лет в Новой Зеландии установлено только семь случаев антракса.

Вспышки антракса отмечены в Папуа – Новой Гвинее.

АЗИЯ

Сибирская язва (антракс) известна в странах Азии очень давно как одна из самых опасных и широко распространенных болезней домашних животных. С 1959 по 1967 гг. на территории Азиатского континента зарегистрировано 26029 вспышек (очагов) и, кроме того, 8261 случай антракса животных, или 42,3% мирового числа вспышек антракса животных и 47,8% отдельных случаев этой болезни. Таким образом, Азиатский континент занимал первое место в мире по числу вспышек и зарегистрированных случаев антракса животных.

Заболеваемость животных антраксом в Азии снижалась: в 1959 г. наблюдалось 3227 вспышек и 4774 случая; в 1960 г. – 4523 и 2025; в 1961 г. – 4178 и 50; в 1962 г. – 2865 и 124; в 1963 г. – 3432 и 38; в 1964 г. – 1672 и 869; в 1965 г. – 1844 и 247; в 1966 г. – 2498 и 109; в 1967 г. – 1795 и 25.

По сравнению с 1959 и 1960 гг., когда общее число вспышек антракса в Азии составило 7750, за 1966-1967 гг. зарегистрировано 4288 вспышек, то есть на 44,7% меньше.

15
Географическое
и на Азиатском
Азия – 18095 вс
7377 и 134; Ю
и 290.
При этом да
и поэтому реал
по всей Азии з
показатели. Те
косвенных исто
ев (вспышек) а
Статистичес
Турция, Иран
составляло 75
уровень заболе
В Иране, С
среди крупного
Таиланде и на
скота, а в Зап
большинстве с
и Западном Па
осе и КНР – с
слонов (И.А.Б.
По данным
нах от Ближне
ном докладе э
тывает страны
в них очень на
D. Joshi (1
ной Азии одно
широко распро
Япония, Син
последние год
Широко р
летальных сл
заболеваний
1996 году бы
– 4 вспышки
отмечено 6 вс
Таиланда Бан
1996 году.

Географическое распределение числа вспышек и случаев болезни на Азиатском континенте представлялось следующим: Западная Азия – 18095 вспышек и 7576 случаев; Южная Азия соответственно 7377 и 134; Юго-Восточная Азия – 484 и 261; Восточная Азия – 73 и 290.

При этом данные по большей части Восточной Азии не известны, и поэтому реальная заболеваемость в этом регионе континента, да и по всей Азии значительно превышает приводимые статистические показатели. Тем не менее на основе известных показателей и ряда косвенных источников Западная Азия выделяется по числу случаев (вспышек) антракса среди других регионов этого континента.

Статистические материалы показывают, что среди государств Азии Турция, Иран и Индия давали вместе свыше 19 тыс. вспышек, что составляло 75,6% общего числа вспышек на континенте. Высокий уровень заболеваемости животных в Ираке и Сирии.

В Иране, Сирии и Бирме эпизоотии антракса наблюдали как среди крупного, так и мелкого рогатого скота, в Камбодже, Лаосе, Таиланде и на Филиппинах – в основном среди крупного рогатого скота, а в Западном Пакистане и Иордании – среди мелкого. В большинстве стран Азии спорадически заболевали лошади, в Иране и Западном Пакистане – верблюды, в Бирме, Южном Вьетнаме, Лаосе и КНР – свиньи, в Бирме и Таиланде регистрировали антракс слонов (И.А.Бакулов, М.Г.Таршис, 1971).

По данным М. Hugh-Jones (1989), антракс персистирует в странах от Ближнего Востока до Юго-Восточной Азии. В своем очередном докладе этот же автор (1994) пишет, что антракс в Азии охватывает страны от Турции до Пакистана и эпизоотическая ситуация в них очень напряженная.

D. Joshi (1998) сообщает, что антракс является для стран Южной Азии одной из опаснейших зооантропонозных болезней. Она широко распространилась в Тихоокеанском регионе в 1976-1996 гг. Япония, Сингапур активно боролись с этой болезнью, поэтому в последние годы антракс там не регистрировали.

Широко распространилась болезнь в Бутане, где отмечено 20 летальных случаев у людей. В Лаосе подтверждены сообщения о заболевании и гибели от антракса людей и скота. В Бангладеш в 1996 году было 240 вспышек болезни у животных; на Филиппинах – 4 вспышки с заболеванием 23 животных; в Таиланде в 1995 году отмечено 6 вспышек у животных и 145 случаев у людей, в столице Таиланда Бангкоке – 9 случаев болезни у животных и 21 у людей в 1996 году.

В Иране заболеваемость антраксом носила эпизоотический характер среди овец, коз и крупного рогатого скота. По данным некоторых авторов, в стране ежегодно погибал от антракса миллион овец. У лошадей, верблюдов и свиней отмечаются спорадические случаи болезни. Максимум заболеваемости приходится на июнь-сентябрь. По данным Т. Fujikura (1989, ВОЗ), в Иране в 1978 г. отмечено 730 случаев антракса у людей, в 1980 г. – 391 и в 1981 г. – 182 случая.

В Афганистане среди овец заболеваемость носит эпизоотический характер, среди коз и лошадей наблюдаются спорадические случаи. Подавляющее число случаев антракса отмечалось в провинциях Герат, Каттаган, Кабул.

В Пакистане наибольшее число вспышек антракса зарегистрировано в восточной части страны. Смертность составляла 70%. Максимум заболеваемости в Восточном Пакистане наблюдали в мае и июне.

В Индонезии, по данным S. Hardjoutomo (1989), антракс является постоянной проблемой. Болезнь известна в стране с 1885 года. Вспышки антракса регистрировали в энзоотичных зонах, погибали животные и люди, преобладали кишечная и кожная формы болезни. С 1976 по 1985 гг. погибло 4310 животных (крупный рогатый скот, буйволы, лошади, овцы, козы, свиньи). С 1986 по 1995 гг. число случаев антракса уменьшилось – погибло 1880 голов скота (S. Hardjoutomo, 1996) (Табл. 2).

В 1976-1985 гг. были поражены антраксом 9 провинций, в 1986-1990 гг. – 5, в 1991-1995 гг. – только 2 (Табл. 3).

Таблица 2.

Антракс в Индонезии. Число случаев гибели животных в 1986-1995 гг. в сравнении с 1976-1985 гг.

10-летний период	Общее число случаев гибели животных	Виды животных
1976-1985	4310	Крупный рогатый скот и буйволы Лошади Овцы и козы Свиньи
1986-1995	1880	Крупный рогатый скот и буйволы Овцы и козы Свиньи Лошади

Таблица 3.
Провинции, в которых обнаруживали антракс
в период 1976-1995 гг.

Провинции	1976-1985	1986-1990	1991-1995
Riau	+	-	-
West Sumatra	+	+	-
Jambi	+	-	-
Jakarta Raya	+	-	-
West Java	+	+	-
Central Java	-	+	-
South Sulawesi	+	-	-
Southeast Sulawesi	+	-	-
East Nusatenggara	+	-	+
West Nusatenggara	+	+	+
Irian Jaya	-	+	-

Т. Fujikura (1989, ВОЗ) сообщил, что в Восточном Тиморе отмечена наивысшая заболеваемость антраксом в 1986 году.

По данным D. Joshi (1998), в Индонезии в 1996 году зарегистрированы 261 заболевшее антраксом животное и 4 случая смерти людей от этой болезни.

В Индонезии антракс чаще поражает крупный рогатый скот и буйволов, среди которых возникают эпизоотии. Спорадические случаи болезни регистрируются среди лошадей, свиней и коз. Она отмечена на Суматре, Бату, Ментавай, Баька, Биллитон, Сумба, на западе острова Тимор, на юге Сулавеси.

На территории Индии антракс регистрируется как спорадически, так и в форме эпизоотий. В 1953 году в этой стране заболело 9628 и пало 7616 животных. Спорадические случаи болезни отмечали среди овец, коз, лошадей, слонов. Частые вспышки болезни отмечены среди водяных буйволов. Эпизоотические вспышки характерны для рогатого скота и буйволов. Для территории Индии особую роль играет перенос возбудителя кровососущими насекомыми. В связи с этим на фоне общей заболеваемости антраксом велик удельный вес кожной формы болезни, протекающей подостро.

Современные данные об антраксе у животных и людей в Индии представлены в работах P. Bhat, D. Mohan, M. Lalitha (1989). Они считают, что ситуация по антраксу животных и людей в стране точ-

но не документирована, но информация, полученная из отдельных источников, указывает на то, что болезнь у животных энзоотична. В течение 1974-1983 гг. было зарегистрировано ежегодно в среднем 300 вспышек. В штатах Andhra Pradesh, Tamil Nadu антракс больше регистрировали у овец и коз, а в штате Karnataka – у крупного рогатого скота (Рис. 3, 4, 5).

Распространению антракса в Индии способствуют:

- 1) выпас животных на контаминированных пастбищах;
- 2) нападение кровососущих насекомых, мух и клещей;
- 3) загрязненные водоисточники;
- 4) передвижение и контакты стад при пастбе.

Сезонность антракса в Индии представлена на рис. 6.

Именно в этих трех штатах отмечены 44 случая антракса у людей. В другой работе эти же авторы описывают 3 случая болезни у людей, протекавшей в виде первичного менингита, кишечной формы и кожной формы с септициемией. Несмотря на интенсивное лечение, все три пациента умерли через 12-14 часов.

M. Lalitha, D. Mathaf et al. (1996) в своей статье «Антракс – постоянная проблема в Южной Индии» описывают вспышку болезни у людей в округе North Arcot Ambedkar штата Tamil Nadu. Первый документированный случай описан у пациента с картиной менингоэнцефалита. Затем с 1977 по 1995 гг. было зарегистрировано еще 37 случаев (Рис. 7).

Среди заболевших – 30 мужчин и 7 женщин, возраст – от 7 до 63 лет, 12 из них имели контакты с животными. У двух кожные поражения в области глаз, что свидетельствует об укусах насекомых – переносчиков возбудителя антракса. Менингоэнцефалит установлен у 25, кожная форма – у 11, септициемия у одного. При энцефалитных формах предполагается путь распространения через слизистую оболочку носовой полости.

D. Joshi (1998) сообщил, что в Индии в 1991-1996 гг. произошло 1613 вспышек антракса у животных, смертность при этом составила 62,5%, из которых 20% приходится на крупный рогатый скот, а 80% – это овцы и козы.

В 1997 году отмечено 225 случаев антракса человека, зарегистрированных в различных штатах Индии, из них 161 – в Tamil Nadu.

В последние 5 лет антракс стал проблемой для Непала (D. Joshi, A. Pradhan, N. Ghimire, 1996). Описана вспышка 1991-1992 гг., во время которой погибли 24 головы крупного рогатого скота, 2 свиньи и 4 лошади. Болезнь распространяется больными животными и за счет инфицированных кормов. Были также зарегистрированы 13 случаев заболевания антраксом людей.

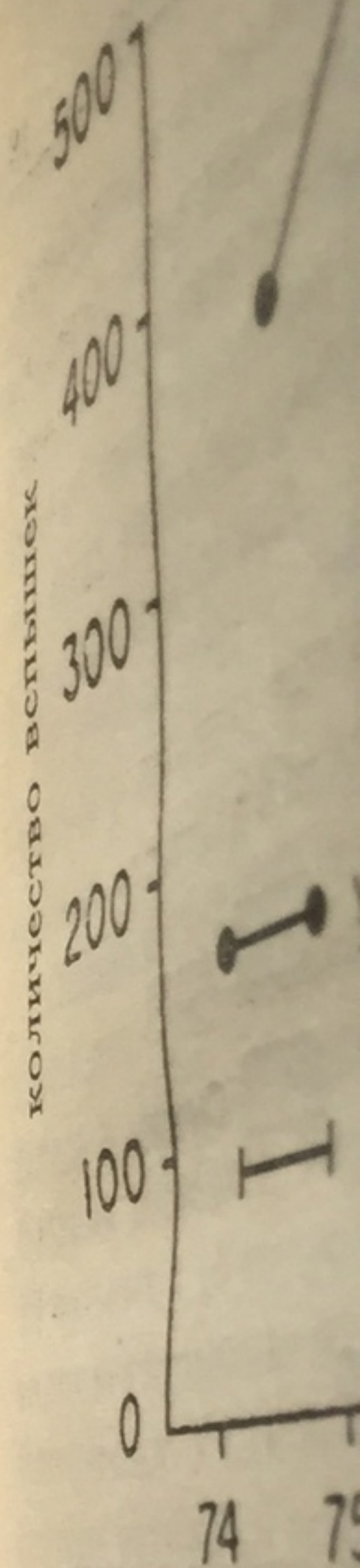


Рис. 3. Антракс животных

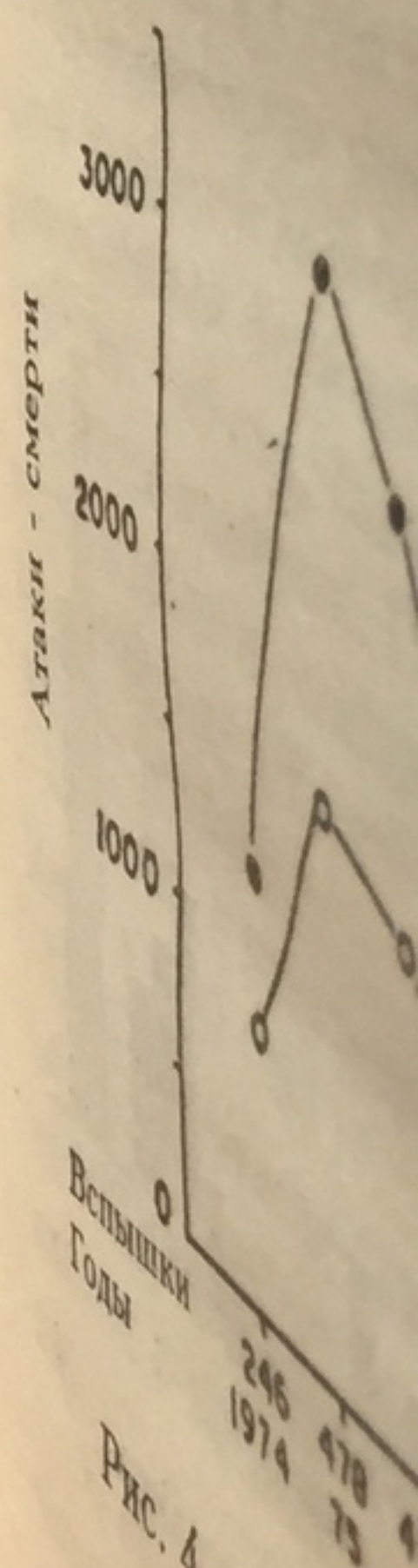


Рис. 4. Антракс животных

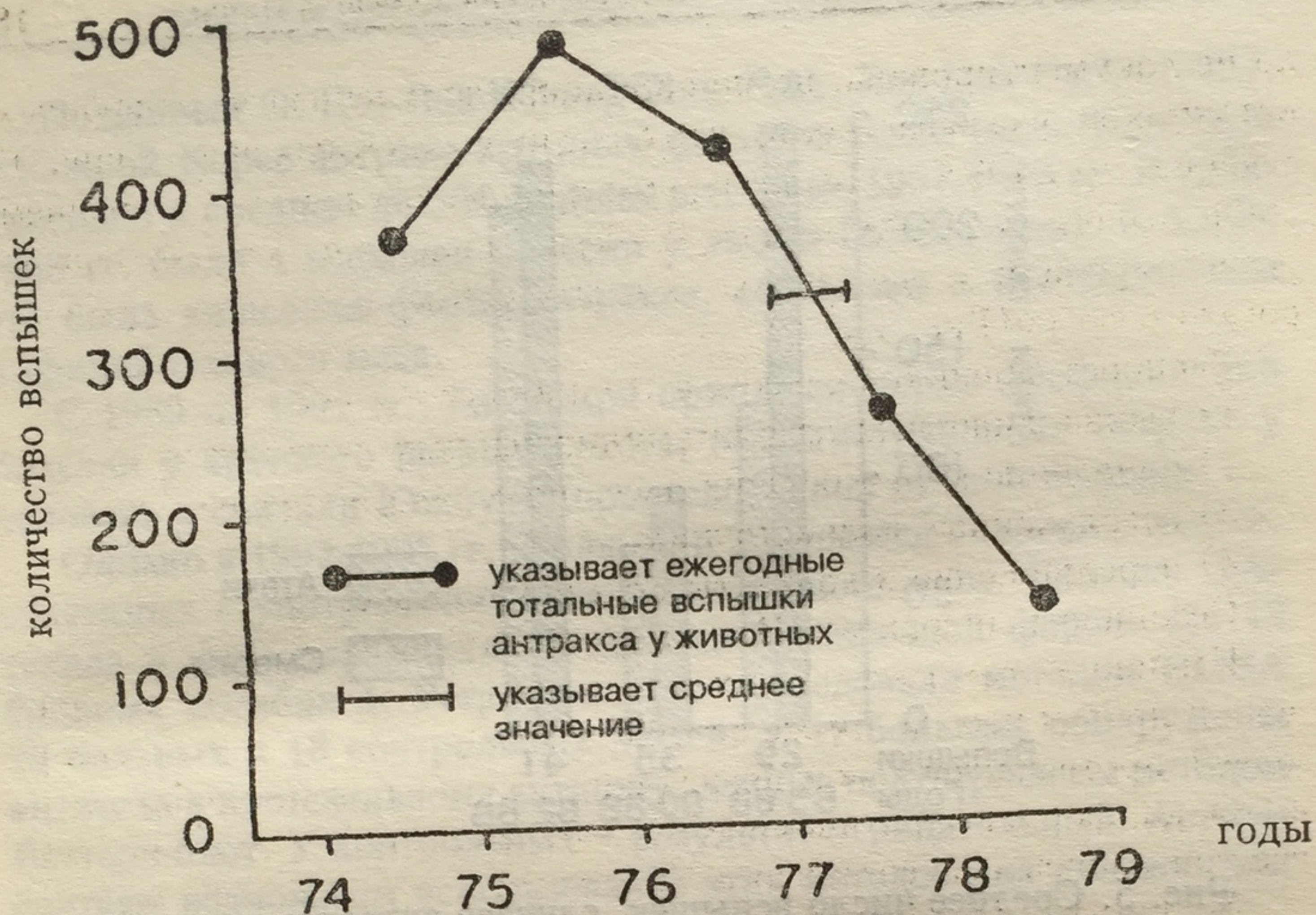


Рис. 3. Антракс животных в Индии. Данные МЭБ 1974-1978 гг.

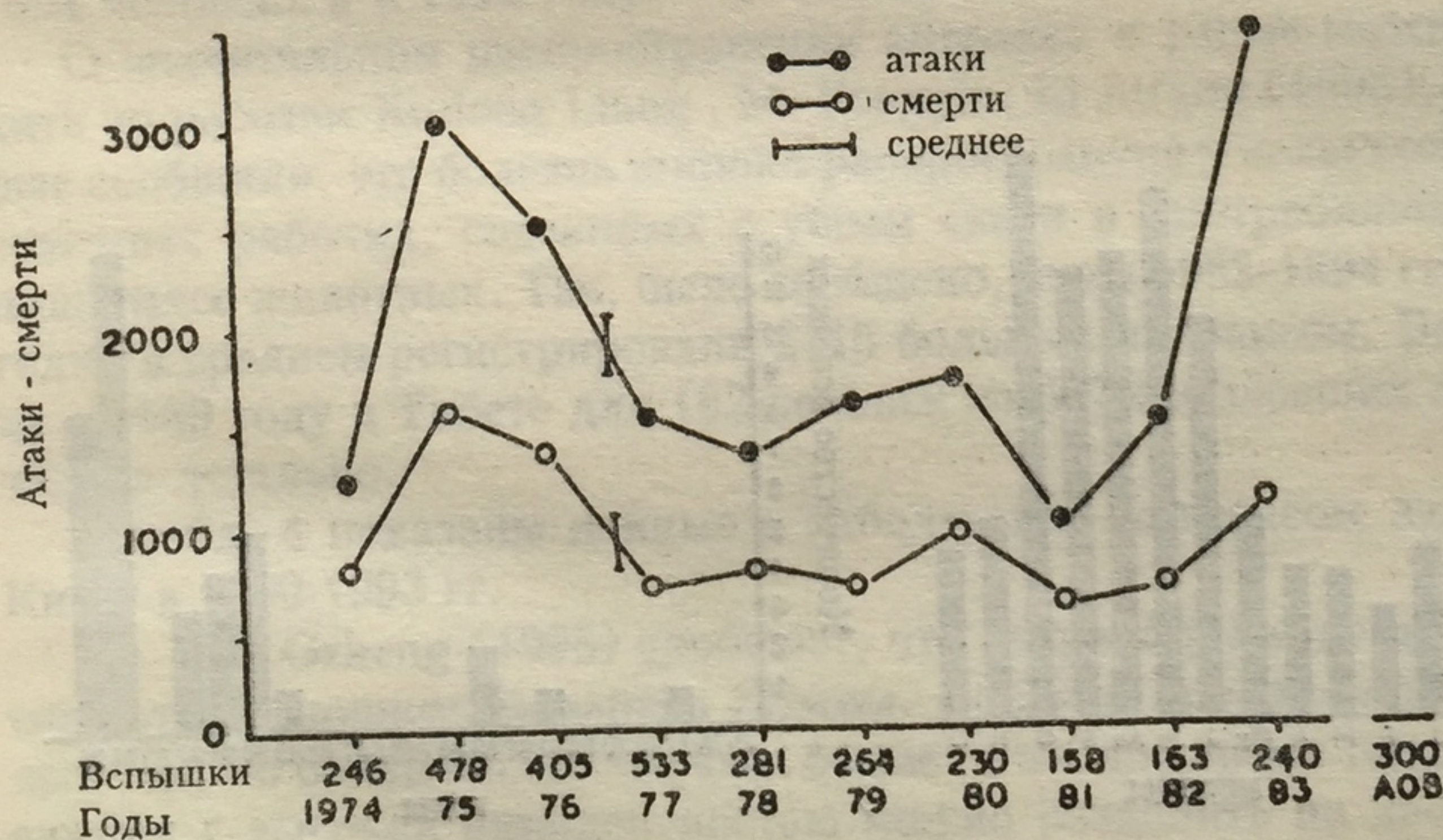


Рис. 4. Антракс животных в Индии. Ежегодные вспышки, случаи и смерти

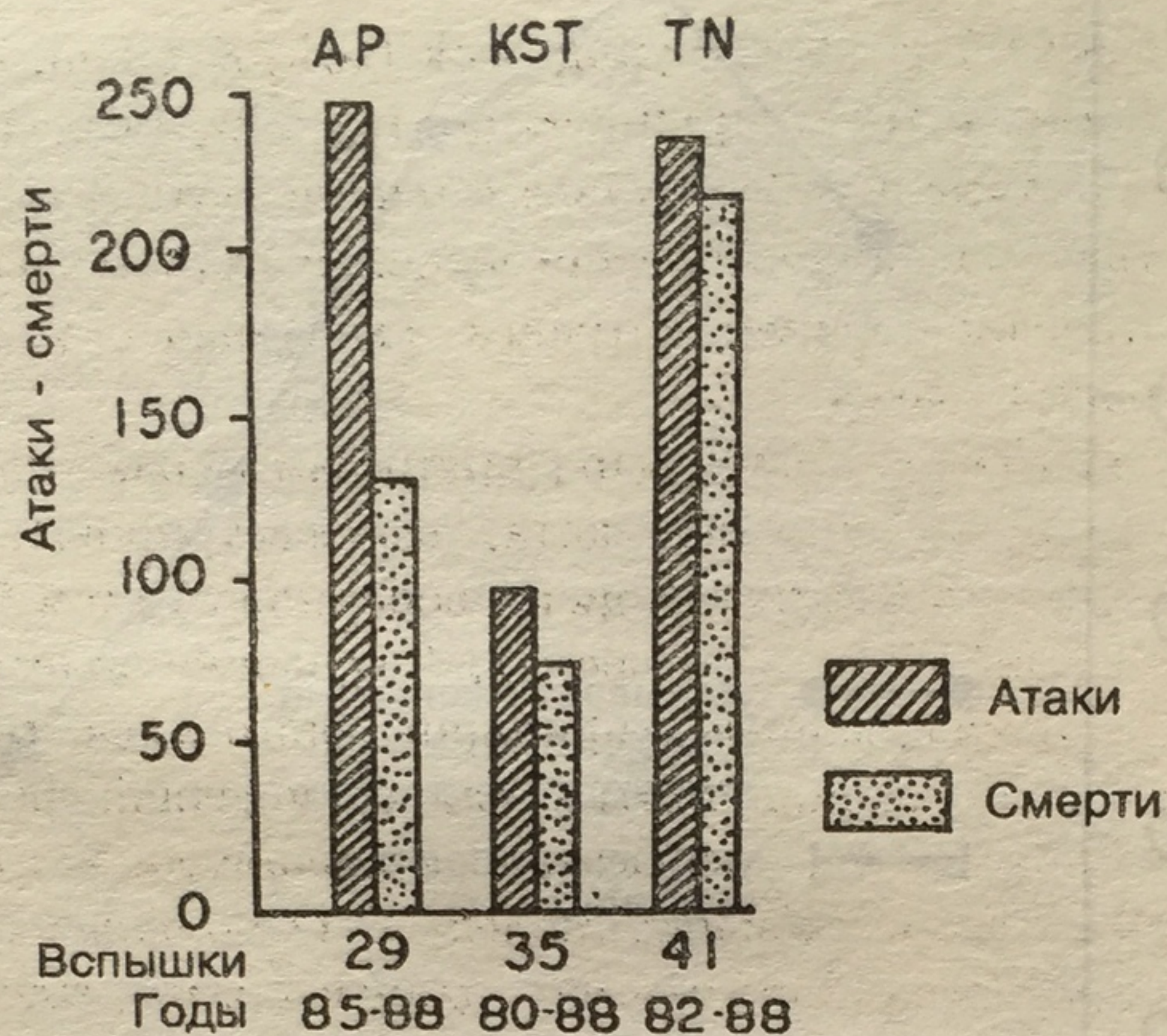


Рис. 5. Среднее число вспышек, случаев антракса и смерти от него скота в трех штатах в Южной Индии (AP - Андхра Прадеш, KST - Карнатака, TN - Тамил Наду)

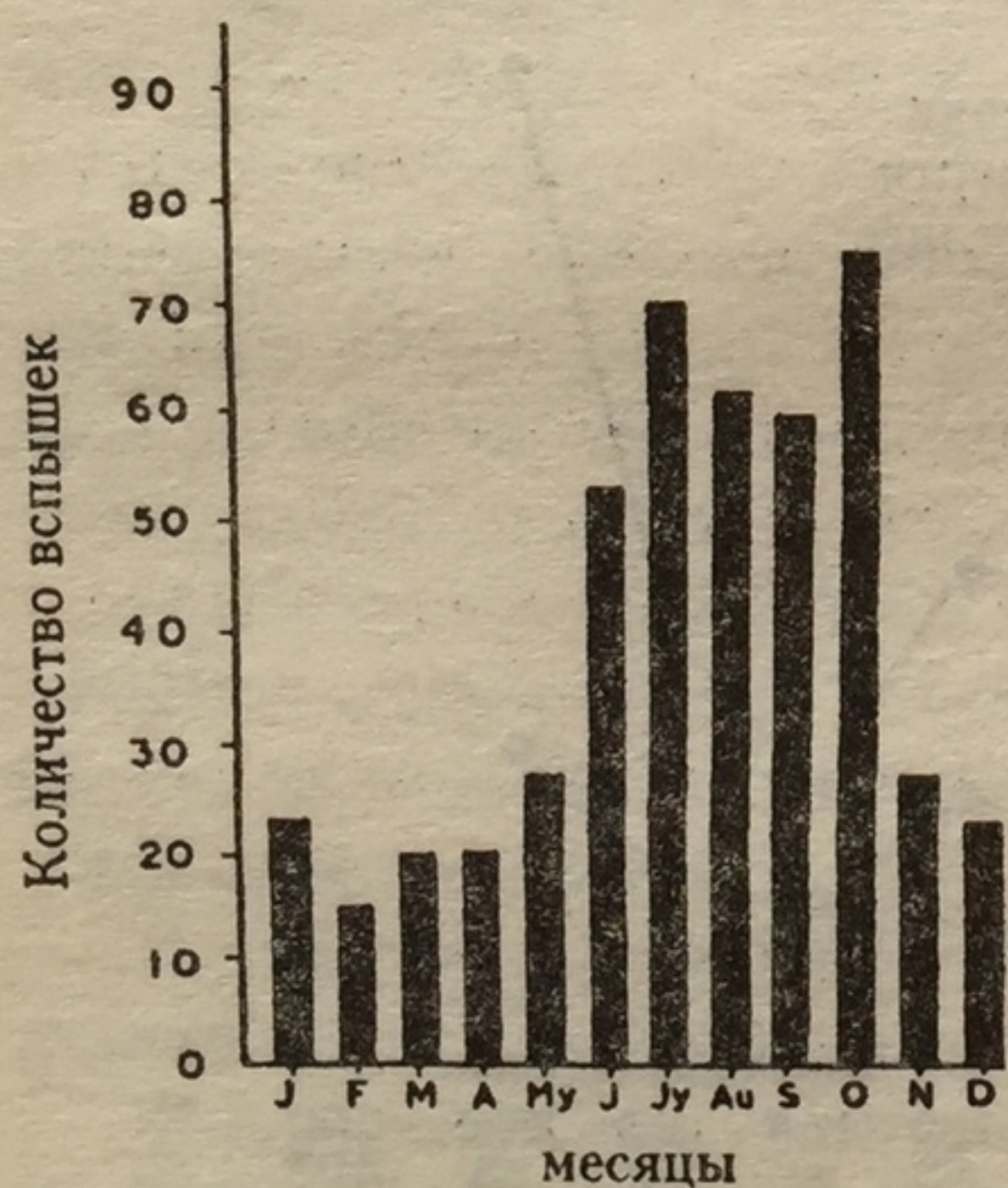


Рис. 6. Ежемесячные вспышки антракса у животных в Индии, январь-декабрь 1975 г. (данные МЭБ)

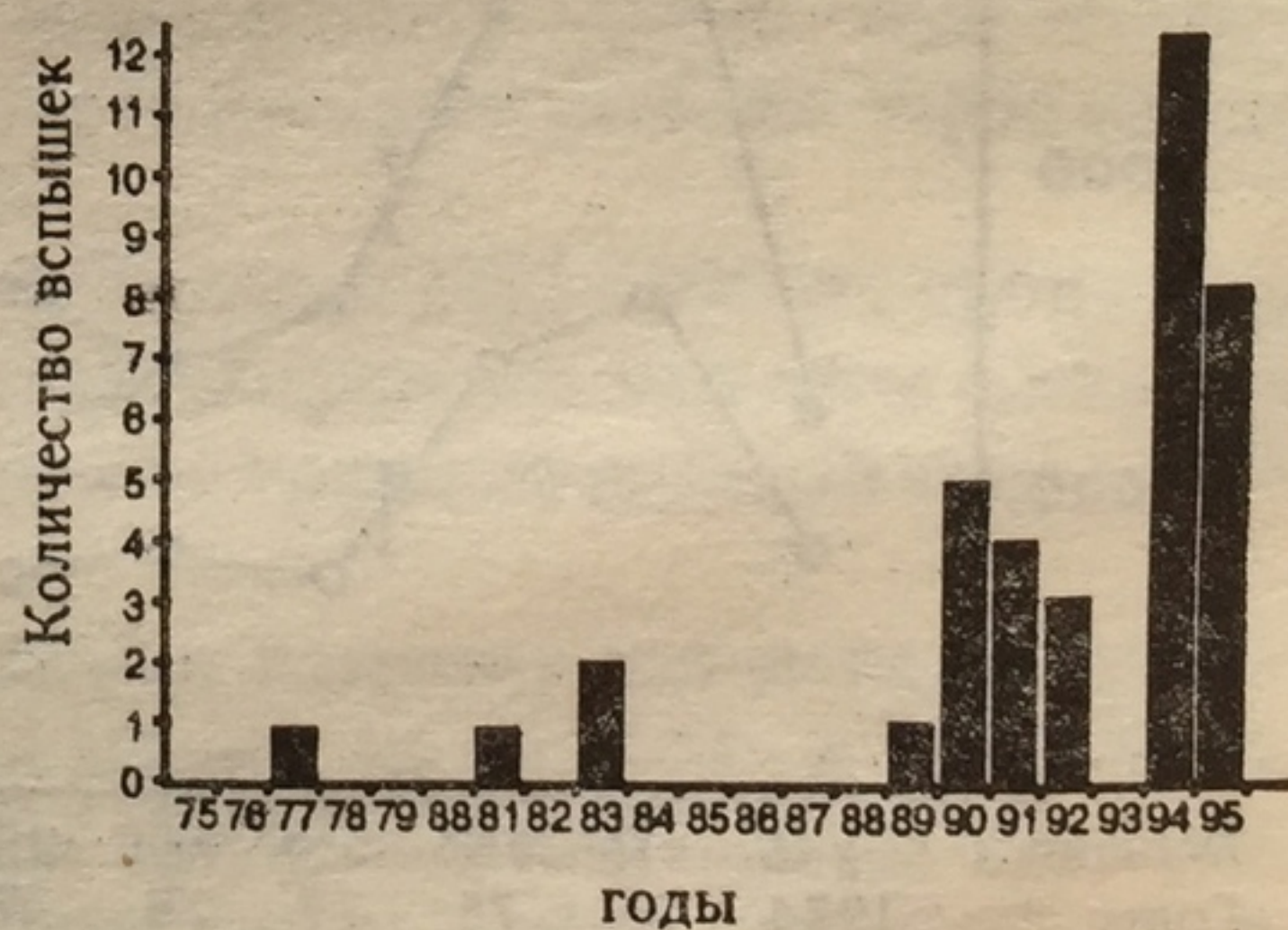


Рис. 7. Случаи антракса в Веллоре

21 По данным О. Нее-В
в Южной Корее антракс
ежегодно в среднем по
1968 г. были 4 вспышки
это была кишечная
инфицированного мя
С 1969 по 1991 г.
болезни у крупного р
человека и считали Ю
Однако в 1992-199
связанных с употреб
текала в виде поража
больных погибли 4.
19 больных и 18 кон
антитела к протектив
Вестерн-блот. У конт
считают возможным
кишечной формы ант
Китай только на
уровне сведения об а
ная картина распрост
еще не известна. Одн
рогатого скота и 150
1654 человека и в 19
О значительном
доть по работам Хид
рые сообщили, что б
ственных рабочих, с
пищу мясо животных
годно в среднем рег
ка в 1989 году в Ти
чилась летально.
В табл. 4 показ
Китае в 1990-1993
Yu Don Gzheng
тируют в основном
тый год, но больш
винции с высокой
пы:
1) провинции, г
чиной заражения
животными;

По данным О. Нее-Bok, Kyung-Seok-Park, Kee-Duk-Park (1996), в Южной Корее антракс крупного рогатого скота регистрировали ежегодно в среднем по 526 случаев в течение 1907-1942 гг. В 1952-1968 гг. были 4 вспышки болезни у людей (85 случаев). В 92,9% это была кишечная форма антракса, связанная с употреблением инфицированного мяса.

С 1969 по 1991 гг., благодаря принятым мерам профилактики болезни у крупного рогатого скота, не регистрировали антракс у человека и считали Южную Корею свободной от этой болезни.

Однако в 1992-1995 гг. наблюдали 3 вспышки болезни у людей, связанных с употреблением инфицированного мяса. Болезнь протекала в виде поражения глотки или в кишечной форме. Из 43 больных погибли 4. Ретроспективно исследовали методом ELISA 19 больных и 18 контрольных людей. У 17 больных обнаружены антитела к протективному антигену, данные подтверждены методом Вестерн-блот. У контрольных – результат отрицательный. Авторы считают возможным использование этих методов для диагностики кишечной формы антракса.

Китай только недавно стал представлять на международном уровне сведения об антраксе у скота (M. Hugh-Jones, 1996). Истинная картина распространения болезни у животных и человека пока еще не известна. Однако в 1993 году заболело 650 голов крупного рогатого скота и 150 – в 1994 году. В 1993 году антраксом заболело 1654 человека и в 1994 году – 15 человек.

О значительном распространении антракса в Китае можно судить по работам Xudong Liang, M. Fenggin, Li Aifang (1996), которые сообщили, что болезнь широко распространена у сельскохозяйственных рабочих, связанных с убоем скота и употребляющих в пищу мясо животных. Так, было сообщено, что в 1985-1994 гг. ежегодно в среднем регистрировали 2115 больных антраксом. Вспышка в 1989 году в Тибете для 162 человек из 507 заболевших закончилась летально.

В табл. 4 показаны данные о заболевании антраксом людей в Китае в 1990-1993 гг.

Yu Don Gzheng (1998) сообщает, что антракс в Китае диагностируют в основном на западе страны. Болезнь проявляется круглый год, но большинство случаев бывает в теплое время года. Провинции с высокой инцидентностью можно разделить на две группы:

- 1) провинции, где преобладает животноводство, там главной причиной заражения служат тесные контакты с инфицированными животными;

Таблица 4.
Случаи заболевания антраксом людей
в Китае в 1990-1993 гг.

Провинции	Число заболевших	Инцидентность	Число смертельных случаев	Смертность (%)
Guihou	3188	2.384	130	4.07
Guangxi	1033	0.595	44	4.25
Yunnan	972	0.608	37	3.81
Hunan	332	0.133	12	3.61
Sichuan	335	0.076	44	13.13
Tibet	327	3.395	34	10.34
Xingjiang	1086	1.781	8	0.74
Qinghai	131	0.713	4	3.05
Gansu	215	0.232	3	1.39
Inner Mongolia	169	0.189	0	0
Весь Китай	8122	0.195	324	3.99

2) юго-западные провинции, где мягкий климат, увеличение числа случаев болезни связывают с инфицированностью окружающей среды.

Liang Xudong (1989) пишет, что история эпидемий антракса в Китае берет начало в китайской традиционной медицине или «Neijing в 2698-2599 гг. до нашей эры». По статистическим данным, с 1956 (начало регистрации) по 1997 гг. зарегистрировано 112148 случаев антракса у людей, в т.ч. 4118 с летальным исходом (3,64%). Средняя инцидентность была 0,028 на 1 млн в год. Отмечено 3 периода пика эпидемий: 1957, 1963 и 1977 гг. с инцидентностью 0,054; 0,065 и 0,054 на 1 млн соответственно. Возможно, что эти эпидемии были связаны с развитием фермерского скотоводства и проведением строительных работ, связанных с водосберегающими технологиями. Однако после каждой вспышки наступал период с низкой инцидентностью болезни, который длился 4-5 лет.

По данным автора, антракс в Китае протекал в последнем десятилетии в северо-западных и юго-западных частях страны с высокой инцидентностью в среднем от 0,016 до 1,082 на 1 млн ежегодно. Люди в этих районах в огромной степени зависят от занятий сельским хозяйством. Экономические и гигиенические условия здесь значительно хуже, чем в восточных провинциях, расположенных на

морском побережье.
Оценивая в целом
отметить следующие
падной и южной час
оптимум антракса ро
Западную Азию.
АМЕРИКА
Сибирская язва
рогатого скота, лоша
де - у крупного рогат
свиней; в Мексике -
свиней.

По данным Н. Wh
национальных обзор
ракса у сельскохозяй
43 из 48 штатов.

В 1945-1955 гг. 6
в 40 штатах с общин

мости пришелся на
антракса у людей, в
бочих, включая 8 вет

Болезнь отмечал
или 0,02% мирового
(за этот же период
Мексике учитывают
чено 3915 случаев а
случаев).

В США за 1959-1
ла очагов (207 очаг
тенденции к уменьш
(352 случая в 1962

М. Hugh-Jones (1
бизонов в Канаде на
территориях, котор

терес обострительств
риодом сексуально
до сезона половой
ню. В распростран
семейства вороньих
территориях заст

морском побережье. Кроме того, тут уделяли недостаточно внимания профилактической иммунизации людей и животных.

Оценивая в целом распространенность антракса в Азии, можно отметить следующее: ареал антракса в Азии имеет оптимум в западной и южной частях континента. На эти части приходится также оптимум антракса рогатого скота, а свиней — на Восточную и Юго-Западную Азию.

АМЕРИКА

Сибирская язва (антракс) зарегистрирована в США у крупного рогатого скота, лошадей, белохвостых оленей, овец и свиней; в Канаде — у крупного рогатого скота, коз, лосей, бизонов, лошадей, овец и свиней; в Мексике — у крупного рогатого скота, коз, лошадей, овец и свиней.

По данным Н. Whitford (1989), в США до 1945 года выпущены 4 национальных обзора по географическому распространению антракса у сельскохозяйственных животных. Антракс обнаружили в 43 из 48 штатов.

В 1945-1955 гг. было зарегистрировано 3569 вспышек антракса в 40 штатах с общими потерями 17868 голов скота. Пик заболеваемости пришелся на 1952 год. В эти же годы отмечено 483 случая антракса у людей, в т.ч. 34 (7%) были у сельскохозяйственных рабочих, включая 8 ветеринаров и 2 лаборантов.

Болезнь отмечали реже в Канаде (за 1959-1967 гг. 14 очагов, или 0,02% мирового числа очагов за этот период), в США — чаще (за этот же период 799 очагов, 1,3% к мировому числу очагов). В Мексике учитывают число случаев болезни — за это же время отмечено 3915 случаев антракса животных (22,6% к мировому числу случаев).

В США за 1959-1967 гг. отмечена тенденция к уменьшению числа очагов (207 очагов в 1959 г. и 43 очага в 1967 г.), в Мексике тенденции к уменьшению числа случаев болезни не обнаруживали (352 случая в 1962 г. и 630 случаев в 1967 г.).

М. Hugh-Jones (1996) описывает эпизоотию антракса у лесных бизонов в Канаде на севере провинции Альберта и северо-западных территориях, которая началась впервые в 1963 году. Вызывает интерес обстоятельство, что болезнь почти полностью ограничена периодом сексуальной активности самцов и начинается за 3 недели до сезона половой охоты, а прекращается с первыми морозами осенью. В распространении антракса принимают участие слепни и птицы семейства вороньих. Наблюдения за проявлением болезни на этих территориях заставляют ученых задуматься над целым рядом воп-

росов, связанных с латентным течением болезни и споруляцией возбудителя. Высказывается мнение о том, что она может быть вызвана специфическим арктическим штаммом. Эпизоотия среди бизонов была широко распространена, но в западных канадских прериях Альберта, Саскечвана отмечаются спорадические случаи у крупного рогатого скота, выпасаемого на пастбищах. Началась эпизоотия случаями в декабре и январе, что подтверждает мнение о роли инфицированного корма.

В. Elkin et al. (1998) также описывают эпизоотию антракса у свободно живущих бизонов в Северной Канаде в Национальном парке Вуд Буфалло, географически отдаленных от бизонов Маккензи, где в период 1962-1993 гг. произошло 9 документированных вспышек. Все эти вспышки вызваны одним штаммом. Сезон болезни — лето, от середины июня до августа, после периода больших дождей и половодья весной. Погибало больше взрослых самцов. Большинство случаев отмечено на богатых кальцием лугах, окружающих отмели озер.

В июле 1993 г. зарегистрирована вспышка антракса, вызвавшая высокую смертность в изолированной популяции свободно живущих бизонов на западе Большого Невольничьего озера. Обнаружены трупы 172 бизонов, трех лосей и трех черных медведей.

Более подробно эпизоотию антракса у бизонов описывают D. Dragon и R. Rennie (1995). В Северной Канаде болезнь впервые была диагностирована у бизонов (*Bison bison*) в районе озера Hook северо-западных территорий в 1962 году (Рис. 8).

В ходе двух следующих летних периодов бизоны этого района продолжали гибнуть от антракса, затем болезнь регистрировалась сначала в районе Гран-Детур, а затем в районе Хей-Камп и «озера № 1» у водяных буйволов Национального парка. В период с 1962 по 1978 гг. 1098 случаев гибели было зарегистрировано в ходе спорадических летних вспышек антракса в 4-х районах: это минимальная оценка действительных потерь, отражающая лишь число туш, обнаруженных бригадами санитарной оценки местности. После лета 1978 года не выявляли случаев антракса в парке и его окрестностях вплоть до лета 1991 года, когда по меньшей мере 34 бизона погибло в Солт-Плейнз, Роп-Лейк (озеро Роп) и районе Парсонз-Лейк (озеро Парсона) в парке.

Большая эпизоотия имела место в августе 1993 года в стадах бизонов заповедника Маккензи-Бизон вокруг озера Фалез, озера Булонь и Слейв-Пойнт.

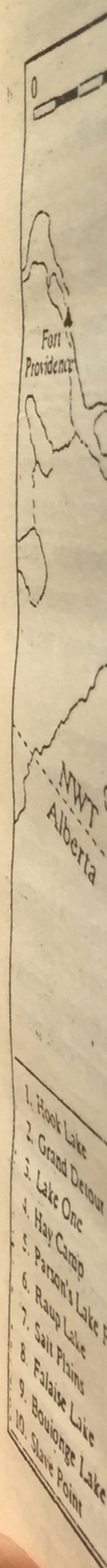
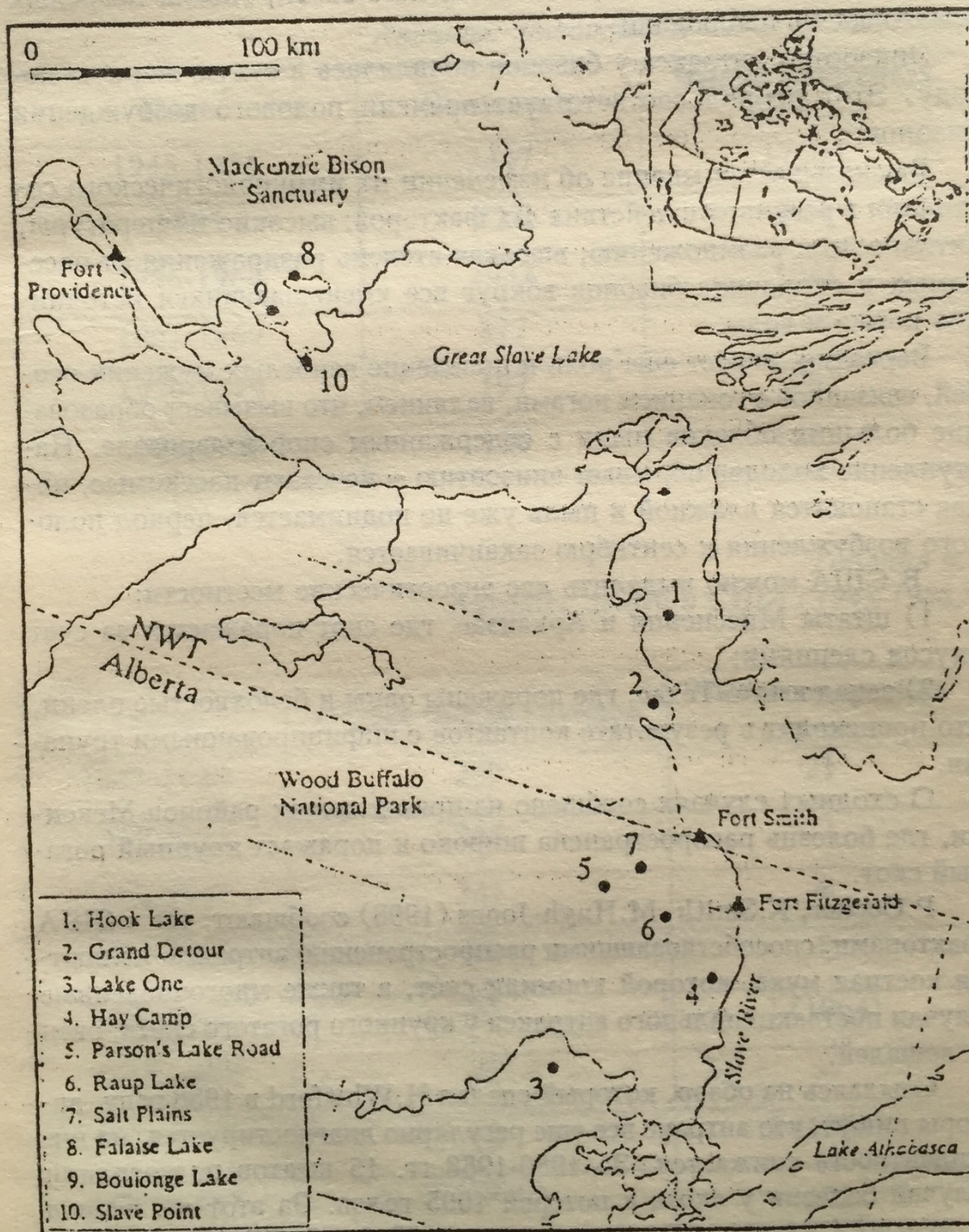


Рис. 8. Ареал эпизоотии антракса бизонов в Северной Канаде с 1962 по 1993 гг.



При каждой вспышке антракса у бизонов в Северной Канаде уровень смертности был значительно выше у половозрелых мужских особей, чем у женских и незрелых (молодых) бизонов. Из 48 подтвержденных случаев гибели бизонов от антракса в Национальном парке водяных буйволов в 1978 году 87,5% составили взрослые мужские особи и 4% – взрослые женские особи, гибели незрелых животных не наблюдали.

Эпизоотия антракса у бизонов появлялась в сухую жаркую погоду. Этот период соответствует времени полового возбуждения бизонов.

Высказывается мнение об изменении их иммунологического состояния в результате действия 4-х факторов: высокие температуры, активность к размножению, высокая степень раздражения от насекомых и скопление бизонов вокруг все уменьшающихся источников корма и воды.

Вероятно, играет еще роль и поведение взрослых мужских особей, связанное с топанием ногами, валянием, что вызывает образование больших облаков пыли с содержанием спор в аэрозоле. Наступление холодов обрывает эпизоотию – исчезают насекомые, почва становится влажной и пыль уже не поднимается, период полового возбуждения к сентябрю заканчивается.

В США можно выделить две энзоотические местности:

- 1) штаты Миссисипи и Арканзас, где скот поражается за счет укусов слепнями;
- 2) запад штата Техас, где поражены овцы и белохвостые олени, что происходит в результате контактов с инфицированными трупами.

О сходных случаях сообщено из прилегающих районов Мексики, где болезнь распространена широко и поражает крупный рогатый скот.

P.Cocker, K.Smith, M.Hugh-Jones (1998) сообщают, что в США факторами, способствовавшими распространению антракса, являются костная мука, которой кормили скот, а также многочисленные случаи поствакцинального антракса у крупного рогатого скота, овец и лошадей.

Ссылаясь на обзор, который сделал H.Whitford в 1988 году, авторы пишут, что антракс все еще регулярно диагностируется, но инцидентность снижается. За 1980-1988 гг. 15 штатов подтвердили случаи болезни у скота с потерей 1005 голов. За этот же период отмечено 4 случая заболевания людей (Табл. 5 и 6). Регулярное сообщение о случаях антракса происходит из штатов, составляю-

27
ших «старый
скота», сюда в
между перевоз
эмпирически
с помощью гео

Годы
1945-19
1955
1956-19
1961-19
1970-19
1980-19

Годы
1945-1948
1949-1953
1954-1958
1959-1963
1964-1968
1969-1973
1974-1978
1979-1983
1984-1988

щих «старый Техасский коридор по перевозке крупного рогатого скота», сюда входят Луизиана, Оклахома, Колорадо и Канзас. Связь между перевозками скота и географией вспышек была установлена эмпирически. Считают, что это положение необходимо подтвердить с помощью географической информационной системы.

Таблица 5.
Антракс животных в США (1945-1988)

Годы	Вспышки	Число смертных случаев
1945-1954	3447	17604
1955	122	264
1956-1960	2032	1627
1961-1969	877	176
1970-1979	197	1085
1980-1988	106	1005

Таблица 6.
Антракс людей в США (1945-1988)

Годы	Общее число случаев	Число смертных случаев
1945-1948	209	21
1949-1953	255	11
1954-1958	141	4
1959-1963	61	1
1964-1968	22	1 (1964)
1969-1973	22	-
1974-1978	12	1 (1976)
1979-1983	1 (1980)	-
1984-1988	3 (1984, 1987, 1988)	-

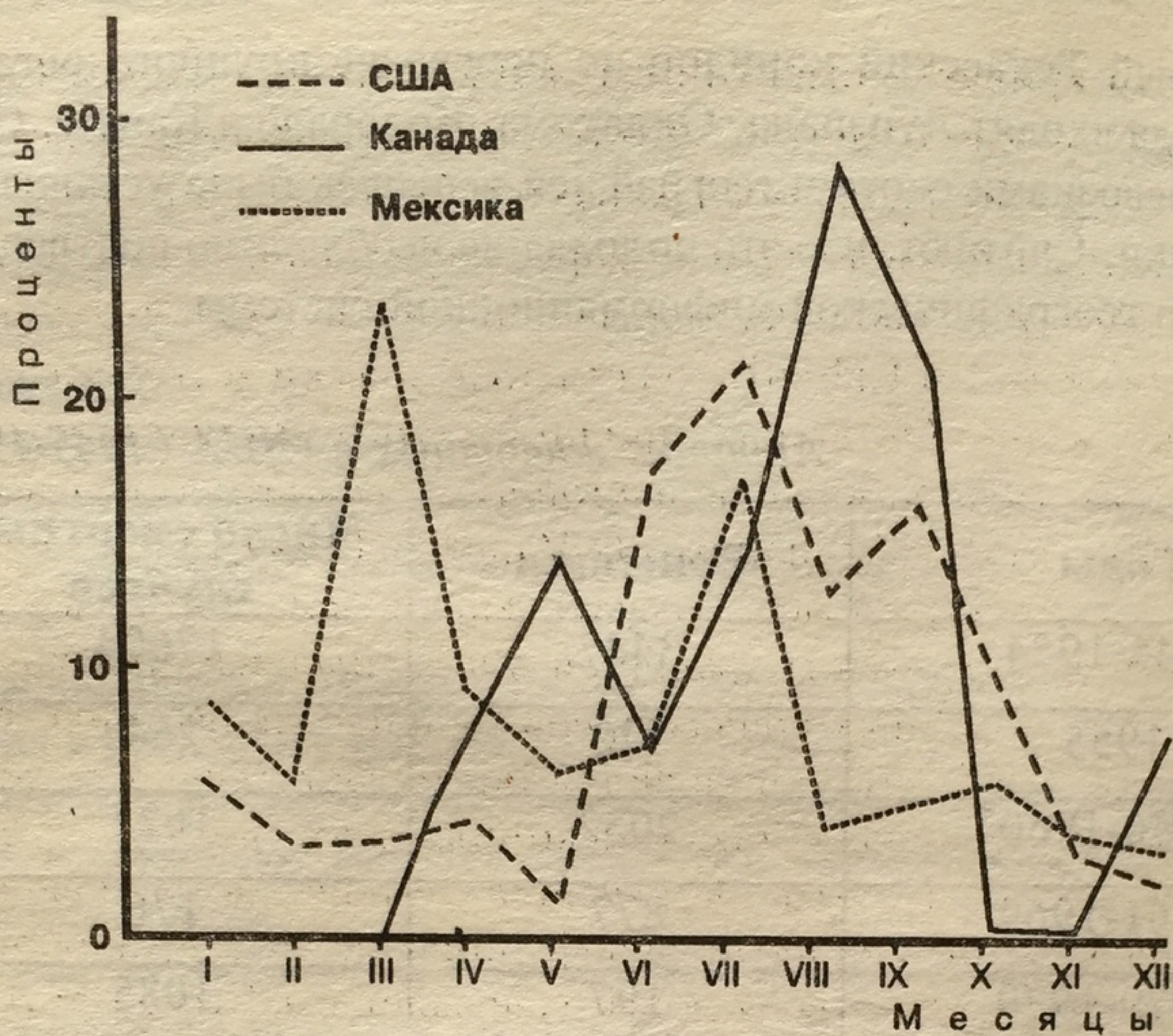


Рис. 9. Сезонность антракса в Северной Америке

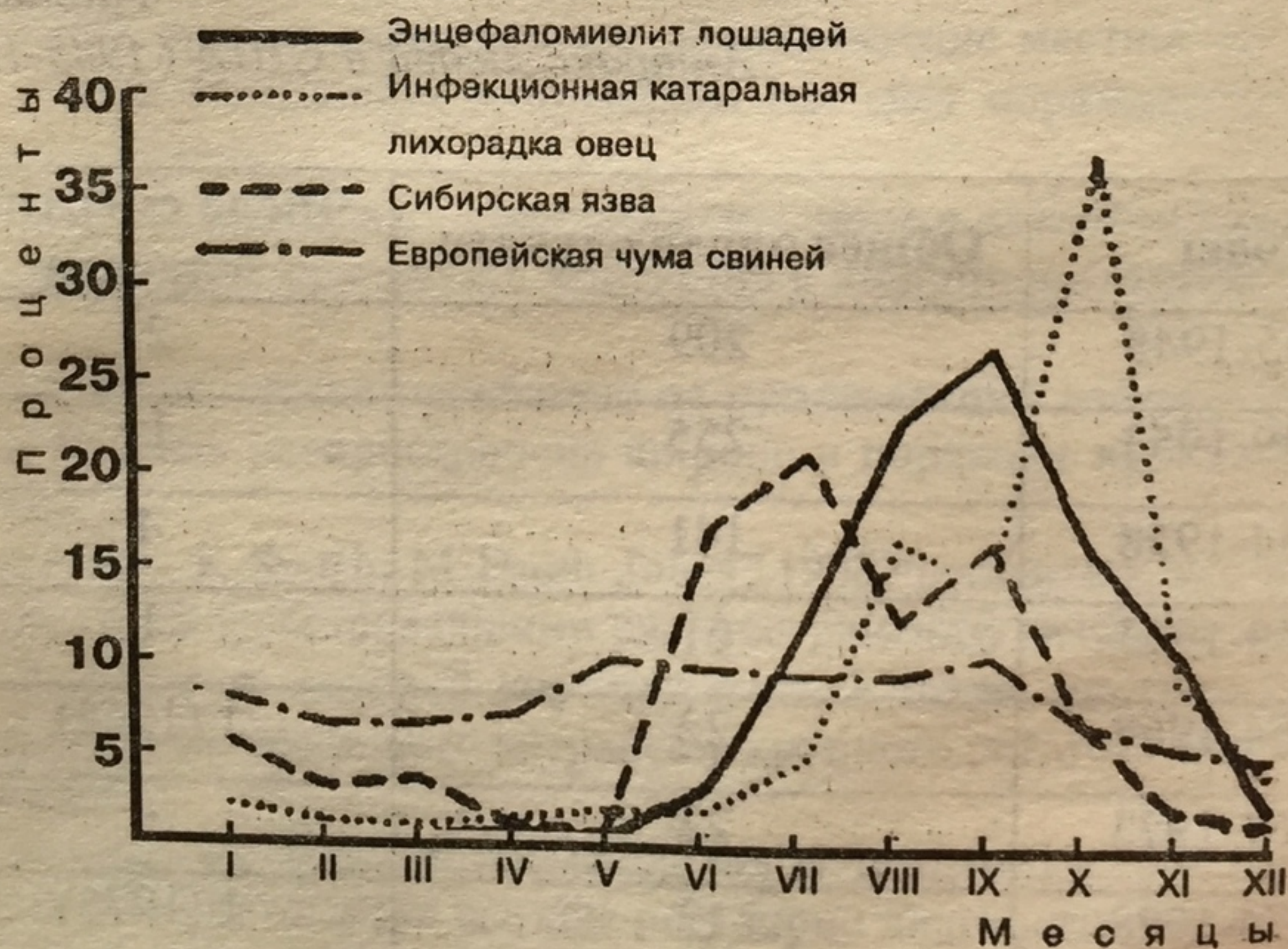


Рис. 10. Сезонность энцефаломиелита, инфекционной катаральной лихорадки овец, антракса и классической чумы свиней в США

Сравнивая к
ной Америки, м
на континенте
Канаде наибо
август). В Ме
весной (март)
ной сезонности
хозяйственных
кий климат) у
ки антракса вс
что возбудите
ных почвах, н
гоприятным м
регам водоемо
мых на сезонн
ных болезней
катаральная
период с сезо

Ареал ант
участков, рез
приходится н
и Мексики (И
Антракс (И
Центральной
лошадей и с
крупного ро
встречалась
гг. отмечено
числа случаев
или 9,5% ми
Во всех
Америки бы
последние го
гг. число сл
По данн
где установ
включена Г
ральной Ам
было сообщ
также возмо
не заявлено

Сравнивая кривую эпизоотии в течение года по странам Северной Америки, можно отметить, что сезонность антракса животных на континенте носит различный характер (Рис. 9). Так, в США и Канаде наибольшее число очагов зарегистрировано летом (июнь-август). В Мексике наблюдается за этот же период два пика — весной (март) и летом (июль), то есть практически четко выраженной сезонности нет. Очевидно, причина такого различия лежит в хозяйственных (использование пастбищ) и климатических (жаркий климат) условиях. По данным G. Van Ness (1959, 1967), вспышки антракса всегда имеют место в сухое жаркое лето. Он установил, что возбудитель антракса сохраняется в незасоленных аллювиальных почвах, нейтральных почвах прерий и в почвах пастбищ. Благоприятным местом обитания является также растительность по берегам водоемов. Возможно также некоторое влияние лета насекомых на сезонность антракса. Не случайно сезонность трансмиссивных болезней (инфекционный энцефаломиелит и инфекционная катаральная лихорадка овец) почти совпадает в США за этот же период с сезонностью антракса (Рис. 10).

Ареал антракса в Северной Америке характеризуется наличием участков, резко отличающихся по уровню энзоотии. Его оптимум приходится на южные части континента, в частности — на юг США и Мексики (И.А.Бакулов, М.Г.Таршис, 1971).

Антракс был зарегистрирован в 1959-1967 гг. в 8 из 12 стран Центральной Америки и поражал крупный рогатый скот, овец, коз, лошадей и свиней. Широко была распространена болезнь среди крупного рогатого скота и свиней, у остальных видов животных встречалась редко. Наибольшее число случаев болезни за 1959-1967 гг. отмечено в Гондурасе — 2177, что составляло 12,5% мирового числа случаев антракса животных, и в Коста-Рике — 1655 случаев, или 9,5% мирового числа случаев.

Во всех неблагополучных по антраксу странах Центральной Америки была отмечена тенденция к уменьшению числа случаев за последние годы; исключение составляет Сальвадор, где за 1964-1967 гг. число случаев увеличилось более чем в 7 раз.

По данным Т. Fujikura (1989), в 1986 г. в число 5 стран мира, где установлена наивысшая заболеваемость животных антраксом, включена Гватемала. М. Hugh-Jones (1996) сообщает, что в Центральной Америке болезнь протекает в виде эпизоотий в Гватемале; было сообщено также о случаях болезни в Гондурасе. В Панаме также возможно существование антракса, хотя об этом официально не заявлено. Для стран Центральной Америки, за исключением Белиза, антракс представляет серьезную проблему.

Антракс в 1959-1967 гг. зарегистрирован в 11 из 12 стран Южной Америки, имел широкое распространение и поражал крупный рогатый скот, овец, лошадей, свиней.

Наибольшее число очагов антракса за 1959-1967 гг. отмечено в Аргентине – 1024, или 1,6% мирового числа очагов, а также в Венесуэле – 552, или 0,8% мирового числа очагов, и 327 случаев болезни, или 1,8% мирового числа случаев. Заметной тенденции к уменьшению числа вспышек или случаев антракса в странах Южной Америки за эти годы не отмечено.

По данным М. Hugh-Jones (1996, 1998), об энзоотичности антракса сообщила Чили. Бразилия многие годы декларировала благополучие по антраксу, однако недавно появились сообщения о возникших случаях болезни, которые еще должны быть подтверждены лабораторно. Уругвай уже год свободен от антракса. Спорадическая заболеваемость антраксом наблюдается в 5 из 10 провинций Перу.

Четко выраженной сезонности антракса в странах Южной Америки не обнаруживается. Есть несколько пиков, однако нарастание числа очагов и случаев все же отмечается в последние месяцы года и лишь в Колумбии отмечен еще пик болезни в феврале.

В Эквадоре антракс опустошил животноводческие хозяйства главным образом приморской полосы республики. На Эквадорском плоскогорье, где весьма развито животноводство и где можно было бы ожидать развития крупных эпизоотий, антракс вообще не регистрируется ни среди животных, ни среди людей. Высказывается предположение о том, что чрезвычайно высокая интенсивность солнечной радиации на плоскогорье губительно действует на возбудителя болезни, в частности на споры.

АФРИКА

На территории Африканского континента сибирская язва (антракс) животных известна с глубокой древности. По официальным данным государств и МЭБ, число вспышек антракса среди животных за 1959-1967 гг. составило 5228, или 8,5% числа вспышек этой болезни в мире. Кроме того, в Африке зарегистрировано за этот период 278 отдельных случаев, или 1,6% от числа случаев во всем мире.

Географическое распределение болезни по регионам континента выглядело следующим образом: Северо-Западная Африка – 472 вспышки; Западная Африка – 818; Северо-Восточная Африка – 539; Восточная Африка – 2218; Центральная Африка – 343; Юго-Восточная Африка – 74; Южная Африка – 764 вспышки. Среди

государств Африки
Танзания, Южная
Африка и Гана, период.

Широкая
регистрировано 4
существенно
хозяйственных
1966 г. на тер
ровано 29 всп
период 1936-1
территории М
ной Африки.

В целом п
уровень забол
значительно.

телей от обще
11,8%, 21,3%,

По данны
числе 5 стран
леваемость ан
ваемости люд
Египет (2043
121 в 1980 г.
1981 г.), Суд

М. Hugh-J
кой зоной по
континентом
бенно Запад
этой болезни
высокой смер
ют с задерж
признать Ег
только посл
результатов

На терри
видового сос
ладанием ро
вотными. Эт
тинента, а та
в целом по к

государств Африки по максимальному числу вспышек выделялись Танзания, Южно-Африканская Республика, Судан, Марокко, Эфиопия и Гана, где число вспышек превышает 200 за рассматриваемый период.

Широкая вакцинация (например, на Мадагаскаре в 1965 г. вакцинировано 4,4 млн голов, в 1966 г. — 2,1 млн) и ряд других мер существенно снизили распространение и заболеваемость сельскохозяйственных животных антраксом. Так, с июля 1965 г. по июнь 1966 г. на территории Южно-Африканской Республики зарегистрировано 29 вспышек антракса против 866 вспышек за аналогичный период 1936-1937 гг. Подобное изменение ситуации характерно для территории Мадагаскара, стран Магриба и отчасти Северо-Восточной Африки.

В целом по континенту и по большинству его регионов и стран уровень заболеваемости животных антраксом изменяется очень незначительно. Например, в течение 1961-1965 гг. колебания показателей от общего числа вспышек антракса по континенту составляли 11,8%, 21,3%, 30,7%, 22,4%, 13,8%.

По данным Т. Fujikura (1989), Судан и Гвинея Биссау состоят в числе 5 стран мира, где в 1986 году была отмечена наивысшая заболеваемость антраксом. Этот же автор приводит сведения о заболеваемости людей в странах Африки: Буркина Фасо (497 в 1977 г.), Египет (2043 в 1979 г.), Кения (327 в 1976 г.), Мали (152 в 1978 г., 121 в 1980 г.), Руанда (300 в 1980 г., 249 в 1981 г.), Сенегал (150 в 1981 г.), Судан (1362 в 1981 г.).

М. Hugh-Jones (1989) считает тропическую Африку энзоотической зоной по антраксу. Он же (1996) пишет, что Африка остается континентом, наиболее пораженным антраксом скота и людей, особенно Западная Африка. Южная Африка считается свободной от этой болезни, но испытывает потери от спорадических вспышек и высокой смертности животных в пораженных стадах, что связывают с задержкой в постановке диагноза. Автор также считает, что признать Египет и Малави свободными от антракса можно будет только после представления убедительных доказательств в виде результатов лабораторных исследований.

На территории Африки отмечается выраженное своеобразие видового состава болеющих антраксом животных, связанное с преобладанием рогатого скота над другими сельскохозяйственными животными. Это своеобразие имеет место и на отдельных регионах континента, а также в пределах природно-географических зон. Так, если в целом по континенту чаще болеет крупный рогатый скот, то в за-

сушливых районах Сахеля и в Сахаре наибольшее число случаев болезни приходится на долю мелкого рогатого скота (овец и коз). Спорадическая заболеваемость лошадей отмечается в Судане, Алжире, Мавритании; верблюдов – в Судане, Эфиопии, Марокко, Республике Чад; свиней – в Гвинейской Республике; слонов – в Либерии.

На Африканском континенте регистрируется значительная пораженность антраксом диких животных. В отдельных районах и национальных парках заболеваемость носит эпизоотический характер. Так, в Национальном парке Крюгера (ЮАР) среди диких животных отмечены эпизоотии антракса, характеризующиеся высокой смертностью. В 1960 году с июня по октябрь в результате эпизоотии пало 1054 диких животных 22 видов. Распространили болезнь хищники, питавшиеся трупами и заражавшие водоемы, а также стадные животные.

Подробно описана эпизоотическая ситуация по антраксу в Национальном парке Крюгера (ЮАР) в работах V. de Vos (1989), V. de Vos and H. Bryden (1996). Авторы изучали экологию антракса и установили на основании пространственного и временного распределения, что болезнь встречается в энзоотичной форме в северной части парка. Отсюда она распространяется периодически, вызывая вспышки в прилежащих областях.

Основным хозяином болезни считается антилопа куду (*Tragelaphus strepsiceros*), которая сохраняет и распространяет антракс (Табл. 7, Рис. 11). Авторы считают, что *Bac. anthracis* в Национальном парке является обязательным паразитом. Его распространение зависит от фазы размножения возбудителя в организме хозяина и выделения во внешнюю среду больших количеств возбудителя. Антракс – это единственная болезнь в экосистеме парка, которая должна убить хозяина, чтобы выжить.

Однако антракс как бы адаптировался к экосистеме, зависит от плотности поголовья и является самоограничиваемой болезнью. Антракс, следовательно, надо рассматривать с точки зрения его влияния на популяцию и экосистему, а не на отдельных индивидуумов, так как смерть индивидуумов может фактически благоприятствовать популяции или экосистеме. По мнению авторов, это почти совершенный естественный механизм выбраковки.

Эпизоотологический цикл антракса в Национальном парке Крюгера показан на рис. 12.

Подчеркивается роль мясной мухи в распространении антракса – питаясь на трупах, мухи инфицируют своими выделениями растения, с которыми возбудитель попадает в кишечный тракт куду.

Поражаемость антраксом части Национального парка Крюгера

Виды животных	Научное название (по латински)
Лошадки антилопы	<i>Hippotragus equinus</i>
Большой гну	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>
Большой коз	<i>Redunca arundinum</i>
Козы	<i>Tragelaphus oryx</i>
Козы	<i>Tragelaphus angasi</i>
Налы	<i>Oreotragus oreotragus</i>
Антилопа-прыгун	<i>Hippotragus hypomelanus</i>
Бегемот	<i>Syntherisma bibos</i>
Антилопа-капитан (дуер)	<i>Syntherisma bibos</i>
Буйвол африканский	<i>Syntherisma bibos</i>
Стебел обоживенный	<i>Raphiceros campestris</i>
Импала	<i>Aepyceros melampus</i>
Зебра бурчелла	<i>Equus burchelli</i>
Козы водной	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>
Жираф	<i>Giraffa camelopardalis</i>
Бородавочник	<i>Phacochoerus aethiopicus</i>
Черная антилопа	<i>Hippotragus niger</i>
Антилопа-сасаби	<i>Damaliscus lunatus</i>
Слон	<i>Loxodonta africana</i>
Стебел Шарпе	<i>Raphiceros sharpei</i>
Пестрая лесная антилопа	<i>Tragelaphus scriptus</i>
Голубой гну	<i>Connochaetes taurinus</i>

Возрастные показатели антрополю и бу

Популяция	Возраст	Опыт (млн-во)
Лошадки антилопы	Взрослая (3 года)	27
	1-3 года	
	молодые	
	самцы	
Буйвол	Взрослая (3 года)	23
	1-3 года	
	молодые	
	самцы	
Буйвол	Взрослая (3 года)	10
	1-3 года	
	молодые	
	самцы	
Буйвол	Взрослая (3 года)	17
	1-3 года	
	молодые	
	самцы	
Буйвол	Взрослая (3 года)	43
	1-3 года	
	молодые	
	самцы	
Буйвол	Взрослая (3 года)	1176
	1-3 года	
	молодые	
	самцы	

Таблица 7.

Поражаемость антраксом видов диких животных в северной части Национального парка Крюгера в эпизоотию 1970 года

Виды животных	Научное название (по латыни)	% исследованных к общему поголовью	% погибших от антракса	Поражаемость в абсолютных цифрах	Поражаемость в %	Ранжирование по поражаемости
Лошадина антилопа	Hippotragus equinus	0,85	11,01	12,95	46,25	1
Большой куду	Tragelaphus strepsiceros	7,00	66,97	9,57	34,18	2
Болотный козел	Redunca arundinum	1,50	1,79	1,19	4,25	3
Канна	Taurotragus oryx	0,60	0,59	0,98	3,50	4
Ньяла	Tragelaphus angasi	5,50	4,18	0,76	2,71	5
Антилопа-прыгун	Oreotragus oreotragus	0,40	0,29	0,73	2,60	6
Бегемот	Hippopotamus amphibius	1,0	0,50	0,59	2,11	7
Антилопа хохлатая (дугер)	Sylvicapra grimmia	2,20	0,89	0,40	1,43	8
Буйвол африканский	Syncerus caffer	16,30	6,25	0,38	1,36	9
Стенбок обыкновенный	Raphicerus campestris	8,50	1,78	0,21	0,75	10
Импала	Aepyceros melampus	30,70	4,77	0,16	0,57	11
Зебра Бурчелла	Equus burchelli	11,00	0,89	0,08	0,29	12
Козел водяной	Kobus ellipsiprymnus	0,80	-	-	-	-
Жираф	Giraffa camelopardalis	0,05	-	-	-	-
Бородавочник	Phacochoerus aethiopicus	1,0	-	-	-	-
Черная антилопа	Hippotragus niger	0,50	-	-	-	-
Антилопа сассаби	Damaliscus lunatus	1,40	-	-	-	-
Слон	Loxodonta africana	6,0	-	-	-	-
Стенбок Шарпе	Raphicerus sharpei	2,20	-	-	-	-
Пестрая лесная антилопа	Tragelaphus scriptus	1,20	-	-	-	-
Голубой гну	Connochaetes taurinus	0,80	-	-	-	-

Таблица 8.

Возрастные показатели поражаемости популяции лошадиной антилопы и буйволов в Национальном парке Крюгера в эпизоотию 1970 года

Популяция	Возраст	Охват (кол-во)	%	Погибло (кол-во)	%	Летальность	То же в %	Ранжирование
Лошадина антилопа	Взрослая (3 года)	27	45,0	25	67,6	1,50	63,3	1
	1-3 года	23	38,3	11	27,0	0,71	30,0	2
	теленки	10	16,7	1	2,7	0,16	6,7	3
	самцы	17	28,3	11	29,7	1,05	51,7	1
	самки	43	71,8	26	70,3	0,98	48,3	2
Буйвол	Взрослые + молодняк (1-3 года)	11760	88,4	20	95,2	1,08	72,48	1
	Молодняк до года	231	11,6	1	4,8	0,41	27,52	2

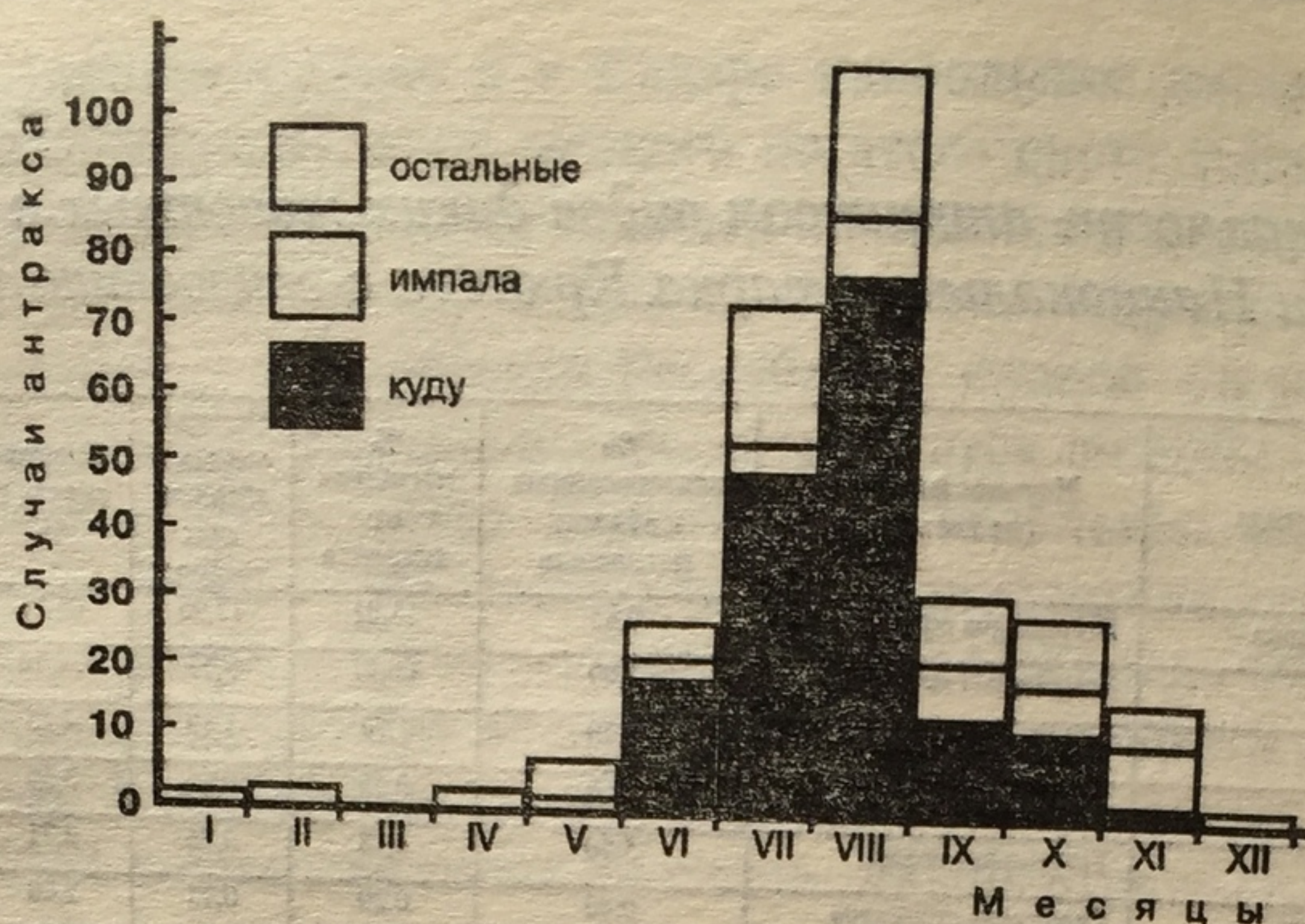


Рис. 11. Помесячное распределение 279 случаев антракса, диагностированных в районе Rafugí Национального парка Крюгера в 1959-1988 гг.

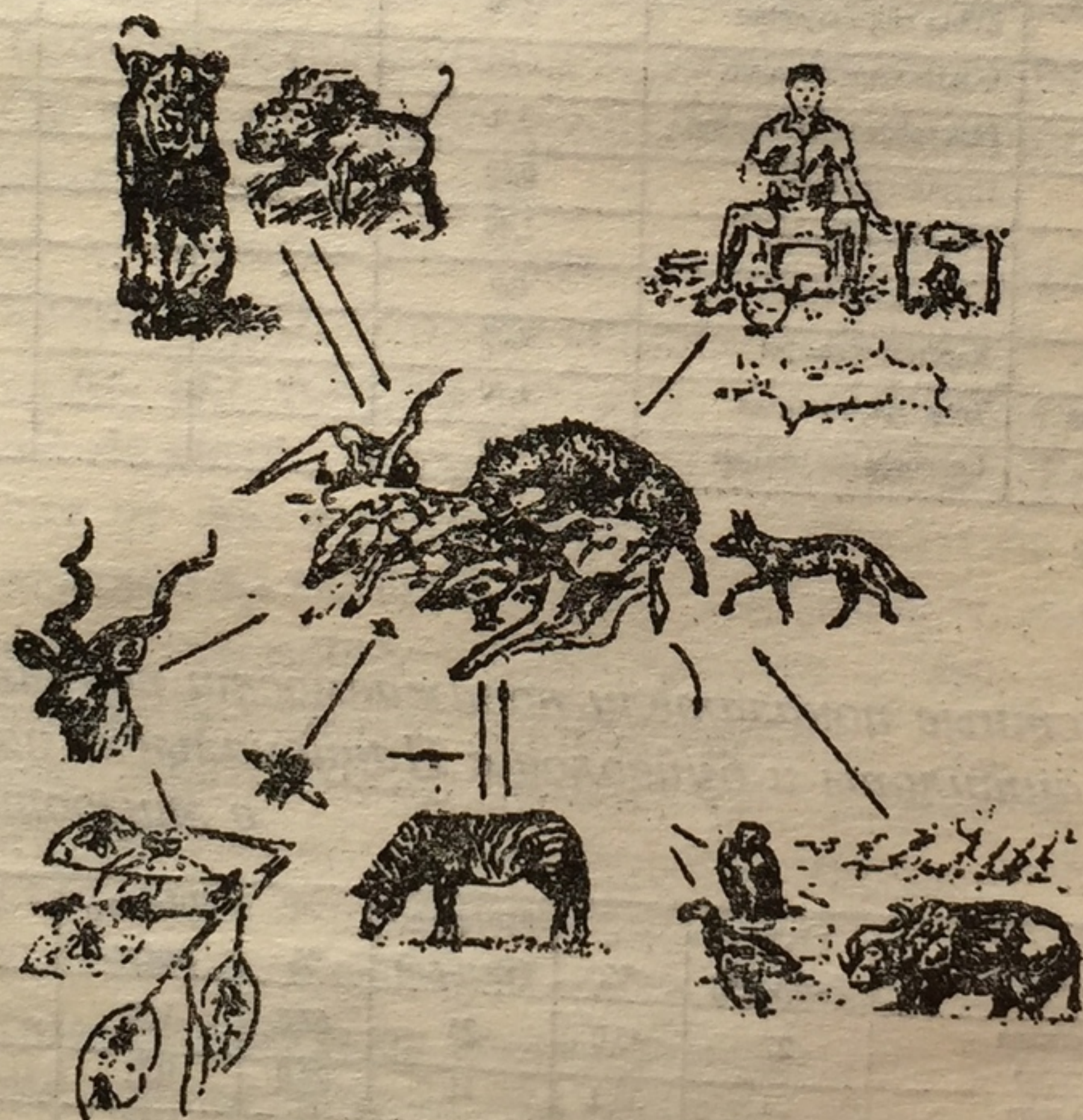


Рис. 12. Эпизоотологический цикл антракса в Национальном парке Крюгера. Антракс следует двумя основными эпизоотологическими путями: через воду посредством ястребов и других животных (падальщиков) или через инфицированную растительность посредством мясных мух

35
K. Smith et al.
нию временного и
anthracis, их рас
лось классифици
лось определени
мента (ПДАФ)
внутри их генома
связь факторов
anthracis, а также
возбудителя инф
бальном распро

В Танзании а
ных видов дик
мая в последне
лась эффективно
блемой для дик
щих 25% террито
распространитьс
питания. Превра
хоронений.

По данным Н
гистрируется с 1
Вспышки у сель
с проводимой в
последних 20-3
ных (Табл. 9).

Вызывает и
Этоша в Намиб
появилась здесь
вания задолго
мость была в 19
за исключением
гг. и одной лока
пы в 1984 г. (Р

Наибольшая
апреле (конец
(Рис. 14).

Была устан
вокруг трупа ж
ры сохраняли ж
дения).

K. Smith et al. (1998) провели серию исследований по определению временного и пространственного распространения штаммов *Bac. anthracis*, их распределения по группам (кластерам). Авторам удалось классифицировать штаммы возбудителя с использованием метода определения полиморфизма длины амплифицированного фрагмента (ПДАФ) для идентификации генетической вариабельности внутри их генома. Применение этих методов позволит исследовать связь факторов риска окружающей среды и классов штаммов *Bac. anthracis*, а также открывает перспективу исследования источников возбудителя инфекции, эволюции и исторических событий в глобальном распространении антракса.

В Танзании антракс распространен спорадически у чувствительных видов диких и домашних животных (S. Jiva, 1996). Проводимая в последние годы широкая вакцинация домашнего скота явилась эффективной мерой. Однако антракс остается серьезной проблемой для диких животных в национальных парках, составляющих 25% территории страны (около 1 млн кв. км). Отсюда он может распространиться с инфицированным мясом и другими продуктами питания. Превратилось в проблему раскапывание гиенами мест захоронений.

По данным H. Jaeger, P. Lindeque (1990), антракс в Намибии регистрируется с 1842 года. Пик заболеваемости был в 1928-1932 гг. Вспышки у сельскохозяйственных животных уменьшились в связи с проводимой вакцинацией, начиная с 1938 года. На протяжении последних 20-30 лет антракс распространился среди диких животных (Табл. 9).

Вызывает интерес обзор по антраксу в Национальном парке Этоша в Намибии (P. Lindeque, C. Brain, P. Turnbull, 1996). Болезнь появилась здесь в 1964 году, хотя есть доказательства ее существования задолго до этого. Наиболее высокая ежегодная заболеваемость была в 1968-1972 гг., затем она оставалась на низком уровне, за исключением двух интенсивных вспышек у слонов в 1981 и 1989 гг. и одной локальной вспышки у зебры Бурчелла и голубой антилопы в 1984 г. (Рис. 13).

Наибольшая смертность степных копытных отмечена в марте-апреле (конец сезона дождей), а у слонов — в конце сухого сезона (Рис. 14).

Была установлена высокая степень инфицированности почвы вокруг трупа животного, погибшего от антракса, в радиусе 5 м. Споры сохраняли жизнеспособность в течение 82 месяцев (срок наблюдения).

Таблица 9
Антракс в Намибии в сельскохозяйственных районах и
Национальном парке Этоша в 1984-1988 гг.

Год	Сельскохозяйственные районы					Национальный парк Этоша	
	Месяц	Район	Виды	Кол-во	Диагноз	Виды	Кол-во
1984	ноябрь	Ondangwa	человек*	2	кишечная	слон	9
			КРС	9	септицемия	зебра	99
			козы	13	септицемия	гну	54
1985	март	Omitara	КРС	4	пневмония	слон	22
			КРС	2	септицемия	зебра	24
	октябрь	Omitara	КРС	5	септицемия	гну	19
1986	сентябрь	Omitara	гепард	5	пневмония	антилопа-прыгун	5
						слон	14
						зебра	38
						гну	38
1987	октябрь	Okahandja	КРС	11	септицемия	антилопа-прыгун	3
						слон	43
						зебра	12
						гну	4
1988	июнь	Omitara	КРС	15	септицемия	антилопа-прыгун	10
	октябрь	Okahandja	сернобык	± 40**		слон	42
		Okahandja	козы	5	септицемия	зебра	12
	декабрь	Ondangwa	козы	15	септицемия	гну	11

Примечание: * дети; ** на 4 фермах по содержанию диких животных; возбудитель атипичного антракса вызывает гибель мышей без проявления септицемии.

Другой источник спор антракса – в фекалиях животных: у гиен высокая концентрация, у грифов – низкая. Эта разница связана с типом питания. Грифы питаются на относительно свежих трупах, поэтому у них менее вероятно попадание спор в желудочно-кишечный тракт. Гиены питаются падалью и поедают костный мозг и кожу, которые в более высокой степени инфицированы возбудителем антракса (Табл. 10).

Серологические исследования с помощью ELISA показали, что в крови у 98% львов, гиен, шакалов обнаруживается высокий титр антител к протективному антигену антракса, в то время как у травоядных животных – лишь у 7%, что коррелирует с показателями заболеваемости и гибели этих видов животных.

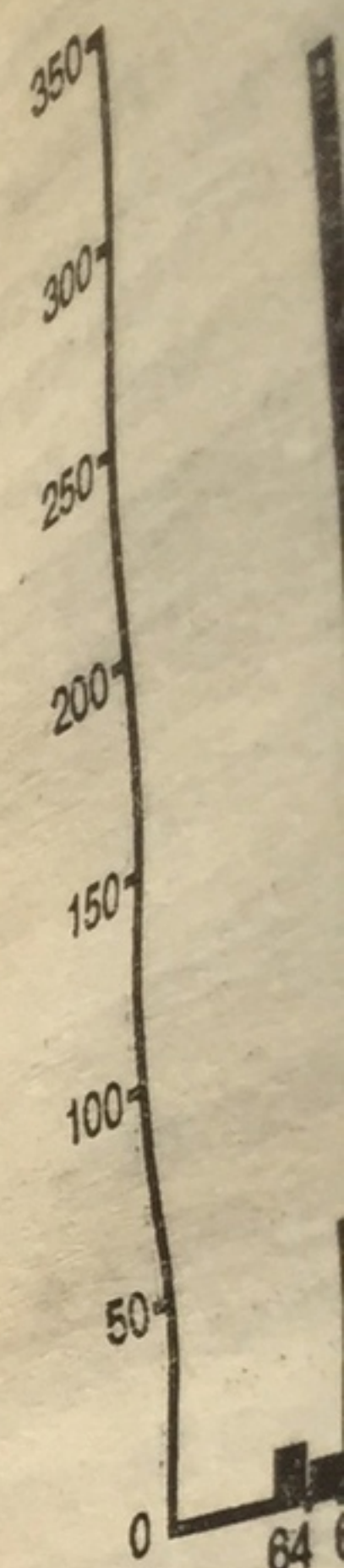


Рис. 13. Смер...

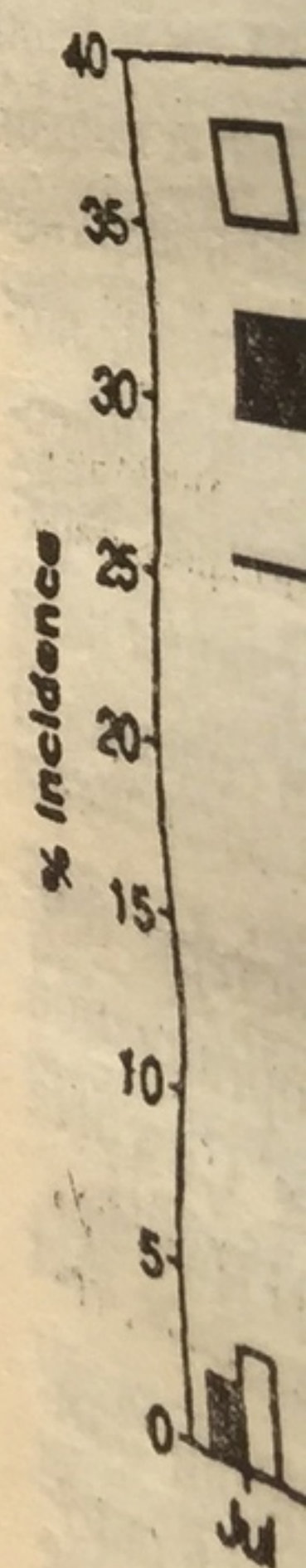


Рис. 14.

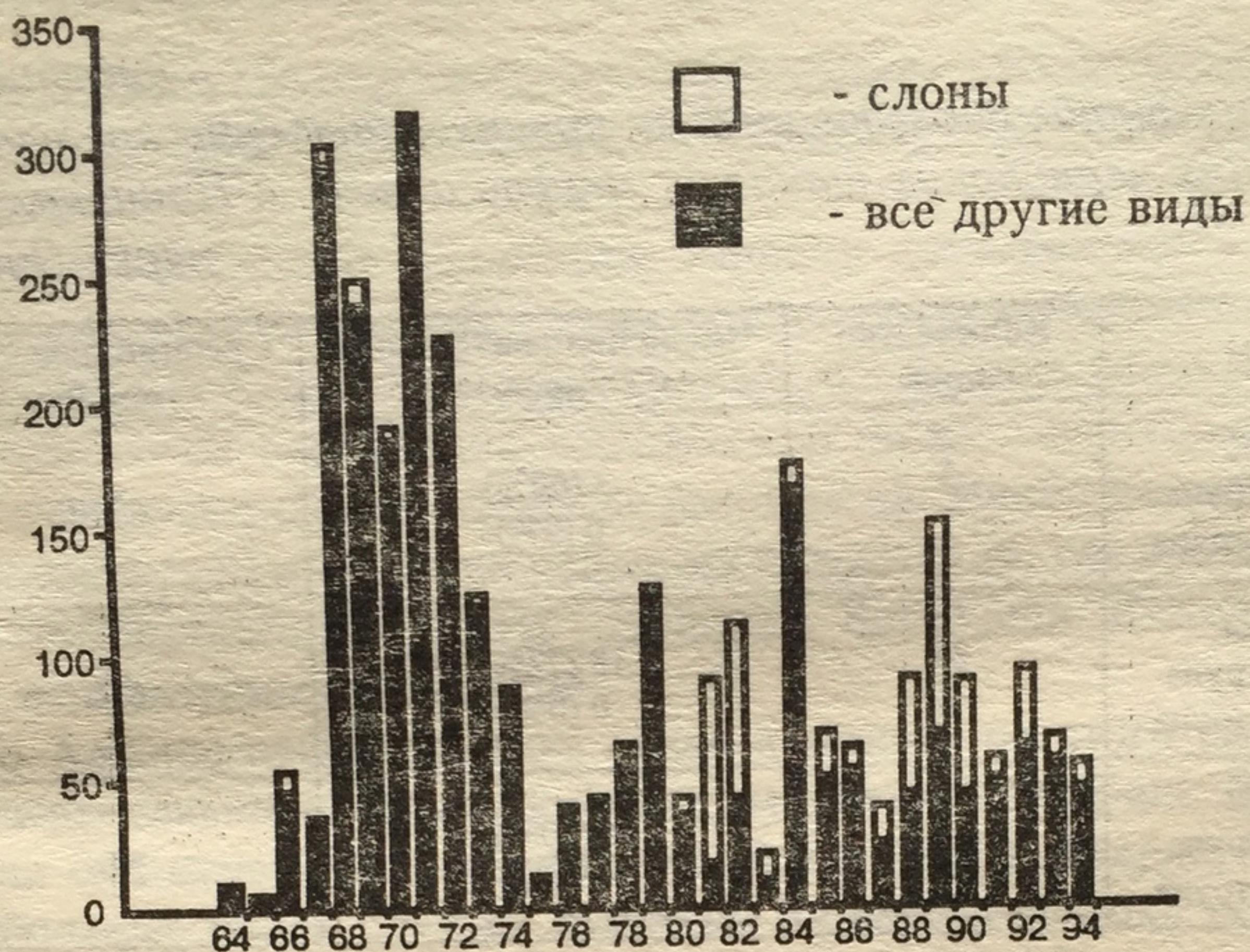


Рис. 13. Смертность от антракса в Национальном парке Этоша



Рис. 14. Ежемесячная инцидентность гибели от антракса и осадки в Национальном парке Этоша

Таблица 10.
Результаты обследования на присутствие спор антракса в фекалиях чернобоких шакалов, грифов и гиен в Национальном парке Этоша

Виды	Количество проб	Число положительных проб	Средний подсчет в граммах
Гиена: вблизи трупа вдали от трупа	5 1	3 (60%) 0 (0%)	6740
Шакал: вблизи трупа вдали от трупа	25 9	18 (72%) 0 (0%)	626
Гриф: вблизи трупа вдали от трупа	18 4	9 (50%) 0 (0%)	34

Интересный факт зарегистрирован в Национальном парке Джоз (Jos) Нигерии – погиб 15-летний африканский слон, у которого было диагностировано одновременное заболевание антраксом и коудриозом. До этого погиб еще один слон с аналогичными признаками. У этих двух животных отмечали частое мочеиспускание, беспокойство, слабость задних конечностей и частые падения. Никаких выделений из естественных отверстий не наблюдали. При вскрытии установили нормальную свертываемость крови, кровоизлияния на поверхностях сердца, тонкого и толстого кишечника, увеличение печени, экссудат в грудной и брюшной полостях, геморрагии на серозной поверхности мочевого пузыря. Селезенка и почки – без изменений. Зараженные патологическим материалом от слонов морские свинки пали в течение 24-48 часов, селезенки у них были увеличены и содержали в изобилии *Bac.anthraxis*.

В мазках из головного мозга слонов обнаружены кластеры темно-синих кокковидных внутрицитоплазматических микроорганизмов в эндотелии, которые были идентифицированы как *Cowdria ruminantium* (P.Okewole, I.Oyetunde, E.Irokanulo, J.Chima, N.Nwankpa, Y.Laleye, C.Bot, 1993).

G.Bbalo (1996) описывает антракс в западной провинции Замбии. В 1970-1975 гг. отмечали локальные вспышки антракса в округах Mongu и Senanga, там же были повторные вспышки в 1981 и 1987 гг. После этого наблюдали тяжелую эпизоотию в 1990-1991 гг. во всех округах этой провинции. В 1991 году заболели 184 человека, из них погибли 35, в 1993 году из 209 заболевших 34 погибли.

39 По данным с...
ке Долины Луан...
бегемотов.

На значитель...
сом носит эпизо...
ка, Южная и К...
особенностями...
ших стад живот...
эпизоотическом...
рые скотопрото...
ка), используе...

В Алжире...
урочены глав...
тании они отм...
наибольшее ч...
Центрально-А...

антракса отм...
ется повсеме...
образом к дол...
число очагов...
том же уровн...
северных са...
Республике...
количеству...
северная ча...

Многочисл...
одна вспышк...
результате...
те составля...
вычисленна...
лах 2 (в 19...
Республик...
вычисленн...

Наибол...
ния живот...
нием скота...
на протяж...
чаются ка...
ЮАР), та...
вб...

По данным средств массовой информации, в Национальном парке Долины Луангвы (Замбия) в 1987 году погибло от антракса 4000 бегемотов.

На значительной территории Африки заболеваемость антраксом носит эпизоотический характер (Западная и Восточная Африка, Южная и Юго-Западная Африка), что прежде всего связано с особенностями содержания животных, а также с перегонами больших стад животных на огромные расстояния. Наиболее опасными в эпизоотическом отношении районами являются те, где проходят старые скотопрогонные тракты (Западная, Восточная, Южная Африка), используемые до сих пор.

В Алжире очаги антракса среди крупного рогатого скота приурочены главным образом к гористым районам пастбищ. В Мавритании они отмечены в округах Од, Восточный и Трарда. В Конго наибольшее число случаев отмечено на северо-востоке страны. В Центрально-Африканской Республике подавляющее число вспышек антракса отмечено в районе Бирао. В Судане антракс регистрируется повсеместно. В Замбии очаги болезни приурочены главным образом к долине реки Замбези. В Республике Берег Слоновой Кости число очагов болезни за последнее десятилетие остается на одном и том же уровне. Максимальное число вспышек зарегистрировано в северных саванновых районах, вблизи скотопрогонных трактов. В Республике Чад антракс локализован в южных районах. В Того по количеству очагов антракса выделяются центральная провинция и северная часть страны.

Многочисленные статистические данные позволяют считать, что одна вспышка антракса дает в среднем 130 случаев заболевания. В результате ежегодно число заболевших на Африканском континенте составляет 60-80 тыс. голов. При этом смертность от антракса, вычисленная на основе материалов по Нигерии, колеблется в пределах 2 (в 1961-1962 гг.) – 10,6% (в 1965-1966 гг.); вычисленная по Республике Нигер – 81%; вычисленная по Республике Мали – 86%, вычисленная по Республике Того – от 75 до 86%.

Наиболее характерен для Африки алиментарный путь заражения животных антраксом. Это подтверждается массовым поражением скота в районах, известных как опасные по этому заболеванию на протяжении многих десятков лет. При этом очаги антракса встречаются как в засушливых районах (Мавритания, Мали, Эфиопия, ЮАР), так и в низменных заболоченных местностях, поймах рек, вблизи озер. В засушливых районах очагами антракса служат многочисленные места водопоев.

шек); Италия (2440); Болгария, Великобритания, Югославия, Албания, Испания. В странах Северной и Центральной Европы спорадические случаи антракса наблюдались в основном среди крупного рогатого скота. В странах Южной Европы и Средиземноморья преобладающим видом среди болеющих животных являлся мелкий рогатый скот, заболеваемость которого носила эпизоотический характер.

В 1993-1994 гг. в Европе наиболее пораженными регионами остаются Турция, Греция, Албания, южная Италия, Румыния и центральная Испания. Скандинавские страны фактически свободны от антракса за счет контроля за импортом мяса, костной муки и правильной утилизации трупов. Однако случаи болезни в Норвегии, уже много лет свободной от антракса, свидетельствуют об эпизоотии, вызванной инфицированным кормом (M. Hugh-Jones, 1989, 1996)

Сезонность антракса в целом по Европе имеет выраженный подъем во второй половине лета с пиком в августе. Однако по различным географическим областям Европы сезонный ход заболеваемости антраксом имеет резкие различия, что непосредственно зависит от особенностей хозяйственных условий животноводства. Так, в Северной Европе (Скандинавские страны, Дания, Исландия) максимум заболеваемости приходится на декабрь-февраль (20% годового числа вспышек) с пиком в декабре и связан он прежде всего с заражением через импортированные корма. Заражение на пастбищах в этих странах имеет меньшее значение, а через кровососущих насекомых на севере Европы заразное начало практически не передается.

В Центральной Европе максимум заболеваемости антраксом падает на март-май (31,1% годового числа вспышек) с пиком в апреле. Это объясняется тем, что весной в период паводков споры возбудителя вымываются из почвы и разносятся часто на большие расстояния. Период весеннего паводка в Центральной Европе совпадает с пребыванием скота в низменных, часто пойменных районах (долины Дуная, Рейна и бассейна их притоков).

В Южной Европе и Средиземноморье максимум заболеваемости регистрируется в июне-августе (43,8% годового числа вспышек) с пиком в августе. В большинстве стран этого района, где пастбищный период продолжается большую часть года, летние месяцы наиболее жаркие, а в засушливых условиях заболеваемость антраксом возрастает (Рис. 15).

Особенностью видового состава животных, болеющих в Европе антраксом, является заболеваемость норок. Причина этих заболеваний — поедание инфицированного корма.



Рис. 15. Сезонность антракса в Европе
(среднегодовое число вспышек)

Антракс продолжает регистрироваться в той или иной степени во всех странах Европы. В Болгарии болезнь энзоотична среди овец, крупного рогатого скота и лошадей. Максимум заболеваемости приходится на июль-сентябрь. Периодичность эпизоотических вспышек — 3-5 лет. Особенно крупные эпизоотии были в 1945-1948 гг. и 1950-1951 гг.

В Болгарии различают очаги антракса четырех видов (степеней): очаги 4-й степени приурочены к горным районам (1656 населенных пунктов), заболеваемость в них незначительная; очаги 3-й степени приурочены к предгорным районам и активны периодически; очаги 2-й степени приурочены к равнинам и предгорьям; очаги 1-й степени (167 пунктов) регистрируются в равнинных и равнинно-холмистых районах и поймах рек, они наиболее опасны и активны. Установлено, что черноземные и наносные почвы Болгарии благоприятствуют, а серые лесные препятствуют распространению возбудителя болезни.

В Румынии антракс распространен во всех климатических зонах страны. Основная масса случаев болезни регистрируется в дождливый период года. Восприимчив к заболеванию крупный рогатый скот от 6 месяцев до 2 лет и реже между 3 и 5 годами. Преимущественно болезнь распространена в восточных районах страны (области Добруджа, Бухарест, Галау, Яссы). Очаги антракса расположены до высоты примерно 1250 м над уровнем моря, распределяясь следующим образом: 78% в областях низких холмов, плоскогорий и равнин и только 22% в горных районах и областях высоких холмов.

В Венгрии основная масса случаев антракса животных приурочена к низинным районам (междуречье Дуная и Тисы).

Вспышки антракса в Словакии чаще всего регистрируют в районах селений, расположенных по поймам рек, преимущественно на юге этой территории, где регулярно наблюдаются наводнения. Болезнь в стране энзоотична. Свыше двух третей случаев заболевания животных в Словакии падает на Прешовскую область.

В Турции местности, неблагоприятные по антраксу, приурочены к Европейской части страны, побережью Мраморного и Черного морей, а также северо-западу и западу Малой Азии и Анатолийскому плоскогорью. Последние десятилетия наиболее высокая заболеваемость скота регистрировалась в илах (провинциях) Стамбул, Бурса, Балыкесир, Маниса, Анкара, Эдирне, Измир, Болу, в районах массовых ярмарок и скотопрогонных дорог. Вспышки антракса регистрируются прежде всего среди овец и коз, затем крупного рогатого скота. В Турции максимум заболеваемости отмечен в августе-сентябре.

По данным М. Doganay (1989), антракс у людей в Европе наиболее часто также обнаруживали в странах Средиземноморья (Испания, Италия, Греция и Турция). Болезнь эндемична в провинции Sivas в Центральной Турции, одной из самых больших сельскохозяйственных областей страны с 1 млн населения. В 1980-1988 гг. в этой провинции зарегистрирован 151 случай антракса у людей, 98 случаев подвергнуты анализу. Оказалось, что это были 43 женщины и 55 мужчин, средний возраст – 39 лет (от 15 до 75). Все женщины – домохозяйки, среди мужчин – 40 фермеров, 3 студента, 3 торговца, 2 рабочих, 2 пастуха, 1 владелец ресторана, 1 мясник, 1 ветеринар, 1 шофер и 1 пенсионер. В последние 10 лет в Турции зарегистрировано 54% случаев антракса во всей Европе и 91% всех случаев, приходящихся на 6 стран Средиземноморья. В 1960-1973 гг. были 13835 случаев антракса у людей и 2595 – в период 1980-1985 гг.

Антракс в этом регионе встречается круглый год, но большинство случаев (78%) летом и осенью. В 79 случаях установлены пути распространения болезни – в 75 это контакты с погибшими животными или продуктами от них, употребление мяса от больных коров или овец.

У 92 пациентов обнаружили кожную форму болезни и у 6 – поражение верхних дыхательных путей. У больных отмечали отеки, высокую температуру тела, лимфаденопатию, токсемию. Лечение осуществляли антибиотиками (пенициллин, стрептомицин, эритромицин); противосибиреязвенную сыворотку не применяли. Из 98 больных погибли от антракса 3 с поражением глотки.

На территории Польши с 1959 по 1967 гг. зарегистрировано 204 вспышки антракса. Уровень заболеваемости (число вспышек) за это время по годам почти не колебался. Максимум вспышек отмечен в 1966 г. – 36, минимум в 1964 г. – 5. Подавляющее число среди заболевших составляет крупный рогатый скот, затем лошади. Главную роль в эпизоотологии антракса в Польше продолжают играть почвенные очаги. Энзоотичные районы характеризуются повышенной влажностью или заболоченностью и расположены на равнинах вблизи рек, ручьев или прудов, которые весной и осенью выходят из берегов. В годы эпизоотий наблюдались разливы рек. Установлено, что в районах, где преобладают твердые глинистые и известковые почвы, возбудитель антракса не сохраняется и эпизоотий не наблюдается. В южных районах страны заболеваемость животных антраксом по сезонам года распределяется следующим образом: январь-март – 13,8%; апрель-июнь – 25,8%; июль-сентябрь – 27,6%; октябрь-декабрь – 32,8%.

СИБИРСКАЯ
Интересный
М. Goreska et al. (1989)
монтом кожаных
еще в XV веке,
этого у него появи
гической жидкост
дырей выделен м
роб является бли
считают его вар
var. cereus.

В Югославии
ется среди овец,
ди лошадей и с
леваний 23,4%
16,4% - в Хорва
Сезонные к
февраль – 12,3%
районах Югосл
октябрь.

В Германии
антракса. Одна
ется тенденция
1967 гг. 41,7%
мости регистр
скота и свине
рировали в 3
13,4% – в Се
более поража
Лауенбург, Г
заболевания

Как уже
мя в основн
благодаря
распростран
встречался

В Швеции
шести. Как
и весенний
фекции – э
мечалась к
портной ко
основном в

Интересный случай описали M.Przybyczewska, I.Matras, M.Gorecka et al. (1996). 37-летний хранитель музея занимался ремонтом кожаных чехлов из кожи коз для мебели, изготовленных еще в XV веке, и при этом повредил гвоздем палец. В результате этого у него появились волдыри, наполненные коричневой геморрагической жидкостью, на ладони и предплечье. Из содержимого волдырей выделен микроорганизм, отнесенный к *Bac.cereus*. Этот микроб является близкородственным *Bac.anthraxis*, некоторые авторы считают его вариантом возбудителя антракса – *Bac.anthraxis* var.*cereus*.

В Югославии основная заболеваемость антраксом регистрируется среди овец, реже среди крупного рогатого скота, еще реже среди лошадей и свиней. Из числа зарегистрированных случаев заболеваний 23,4% отмечено в Боснии и Герцеговине; 39% - в Сербии; 16,4% - в Хорватии; 15,8% - в Македонии.

Сезонные колебания в целом по стране составляют: декабрь-февраль – 12,3%; март-май – 22,5%; июнь-август – 43,8%. В южных районах Югославии максимум заболеваемости приходится на июнь-октябрь.

В Германии в 1959-1967 гг. были зарегистрированы 704 вспышки антракса. Однако, как показывают статистические данные, наблюдается тенденция к уменьшению заболеваемости, она составляла в 1965-1967 гг. 41,7% заболеваемости за 1959-1961 гг. Вспышки заболеваемости регистрировались главным образом среди крупного рогатого скота и свиней. Из общего числа заболеваний 25,5% случаев регистрировали в Земле Шлезвиг-Гольштейн; 23,8% – в Нижней Саксонии; 13,4% – в Северной Рейн-Вестфалии. В Шлезвиг-Гольштейнии наиболее пораженными являются округа Плен, Стормари, Рендебург, Лауенбург, Шлезвиг, Эутин, Стойнбург. В Южной Германии случаи заболевания отмечали в округах Геттингена и Ресс.

Как уже было отмечено, Скандинавские страны в настоящее время в основном благополучны по антраксу. Этого удалось достичь благодаря принятым мерам по предотвращению возникновения и распространения этой болезни. Однако в прошлые годы антракс встречался довольно часто.

В Швеции ежегодное число вспышек антракса не превышало шести. Как правило, почти все случаи приходятся на осенне-зимний и весенний периоды. Основной фактор передачи возбудителя инфекции – зараженные импортированные корма. В 1956-1966 гг. отмечалась крупная эпизоотия антракса среди свиней, вызванная импортной костной мукой. Заболеваемость животных регистрировали в основном в южных ленах Кальмэр, Кристианстад, Мальмехус.

В Норвегии ежегодно регистрировали не более 10 вспышек антракса. Максимум заболеваний приходился на зимне-весенний период. Спорадические случаи болезни регистрировали главным образом среди крупного рогатого скота. В прежние годы основная масса заболевших антраксом животных была сосредоточена в южной части страны – в Фюльке, Бускеруд, Ахерсхус, Хедмарк, Вест-фолль, Ругалани, Телемарт.

В Великобритании заболеваемость животных антраксом была связана в основном с инфицированными кормами. С 1959 по 1967 гг. ежегодно было не менее 220 вспышек. Максимум заболеваемости приходился на зимний и весенний периоды. Свыше 80% случаев заболеваний регистрировали среди крупного рогатого скота. Энзотичным по антраксу районом Англии является долина реки Нене в Нортгемптоншире.

По данным P.Turnbull, F.Stuart, N.Barrett, J.Melling (1989, 1996), в Англии и Уэльсе в 1961-1980 гг. отмечено 145 случаев антракса у людей, в т.ч. со смертельным исходом.

Снижение заболеваемости людей антраксом можно видеть на рис. 16.

Антракс животных в Великобритании начали официально регистрировать с 1938 года. С 1980 года было менее 20 случаев в год (Табл. 11 и Рис. 17).

За последние годы в стране используется ежегодно примерно 4000 доз вакцины против антракса для иммунизации животных и 4000-5000 доз для вакцинации людей в зонах риска. Есть тенденция к снижению этого количества, по крайней мере временная, связанная с прекращением производства живой споровой вакцины.

По данным этих же авторов, было исследовано 1342 пробы материалов из окружающей среды, взятых в 95 местах в период с 1987 по 1995 гг. В 43 пробах (3,2%) из 14 мест (15%) обнаружены вирулентные изоляты *Bac.anthraxis*. Число спор (колониеобразующих единиц) 100 КОЭ/гр было в 13 положительных пробах, но 9 из них были из одного и того же места, которое служит для утилизации трупов.

Интересное сообщение сделано специалистами Управления химической защиты (Порт Даун, Великобритания) R.Manchee, M.Broster, A.Stagg, S.E.Hibbs, B.Patience (1989) о положении на острове Gruinard (Рис. 18).

Этот остров во время 2-й мировой войны был местом первого научного испытания *Bac. anthracis* в качестве погенциального агента биологического оружия. Испытания подтвердили, что жизнеспособ-

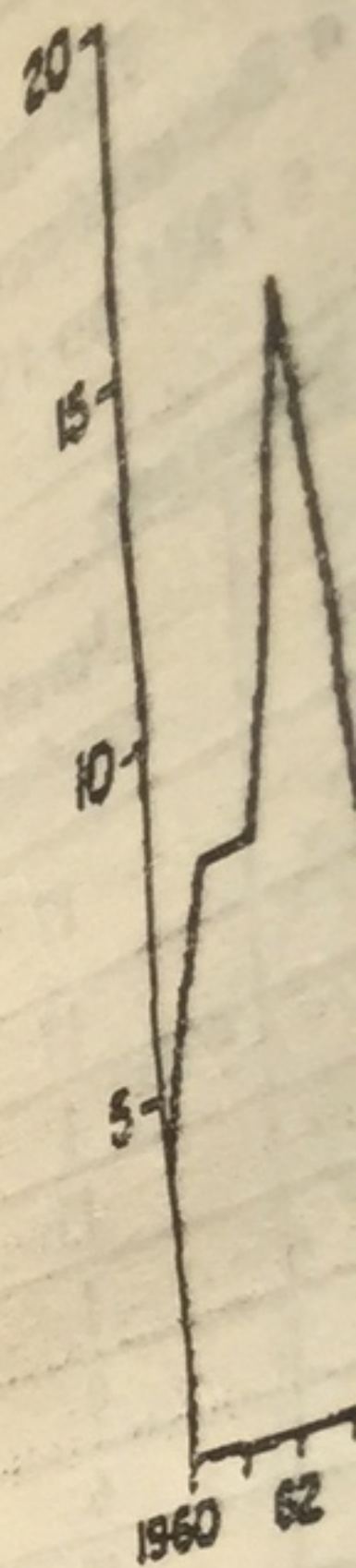
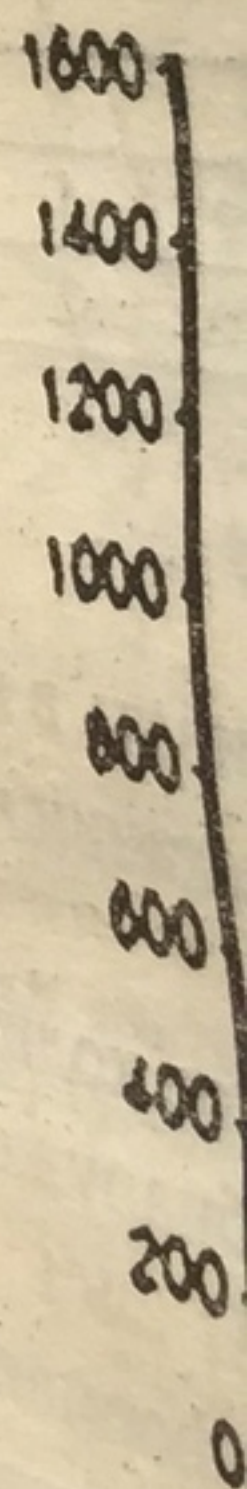


Рис. 16. Ант



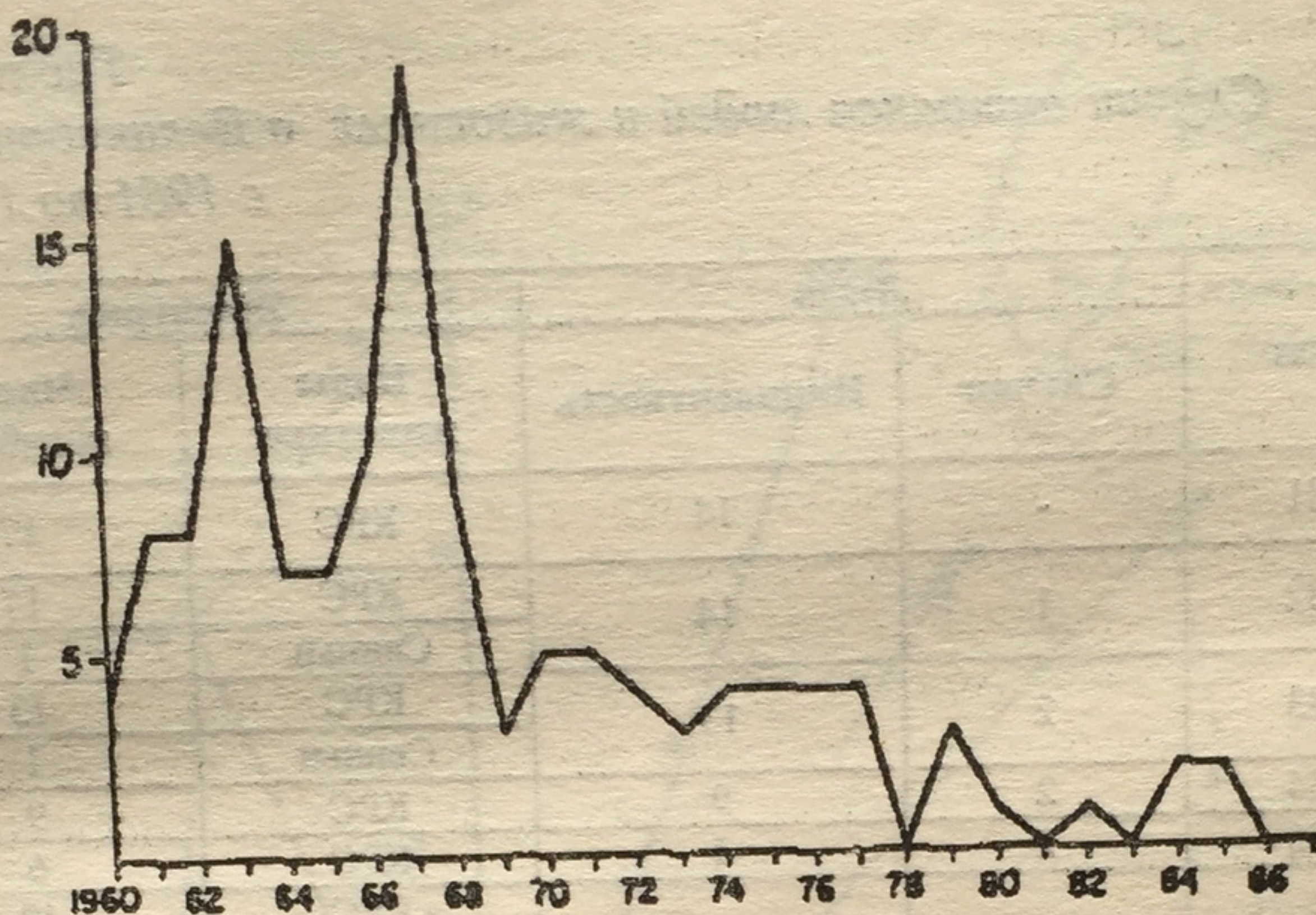


Рис. 16. Антракс у человека. Регистрации - Англия и Уэльс 1960-1987 гг.

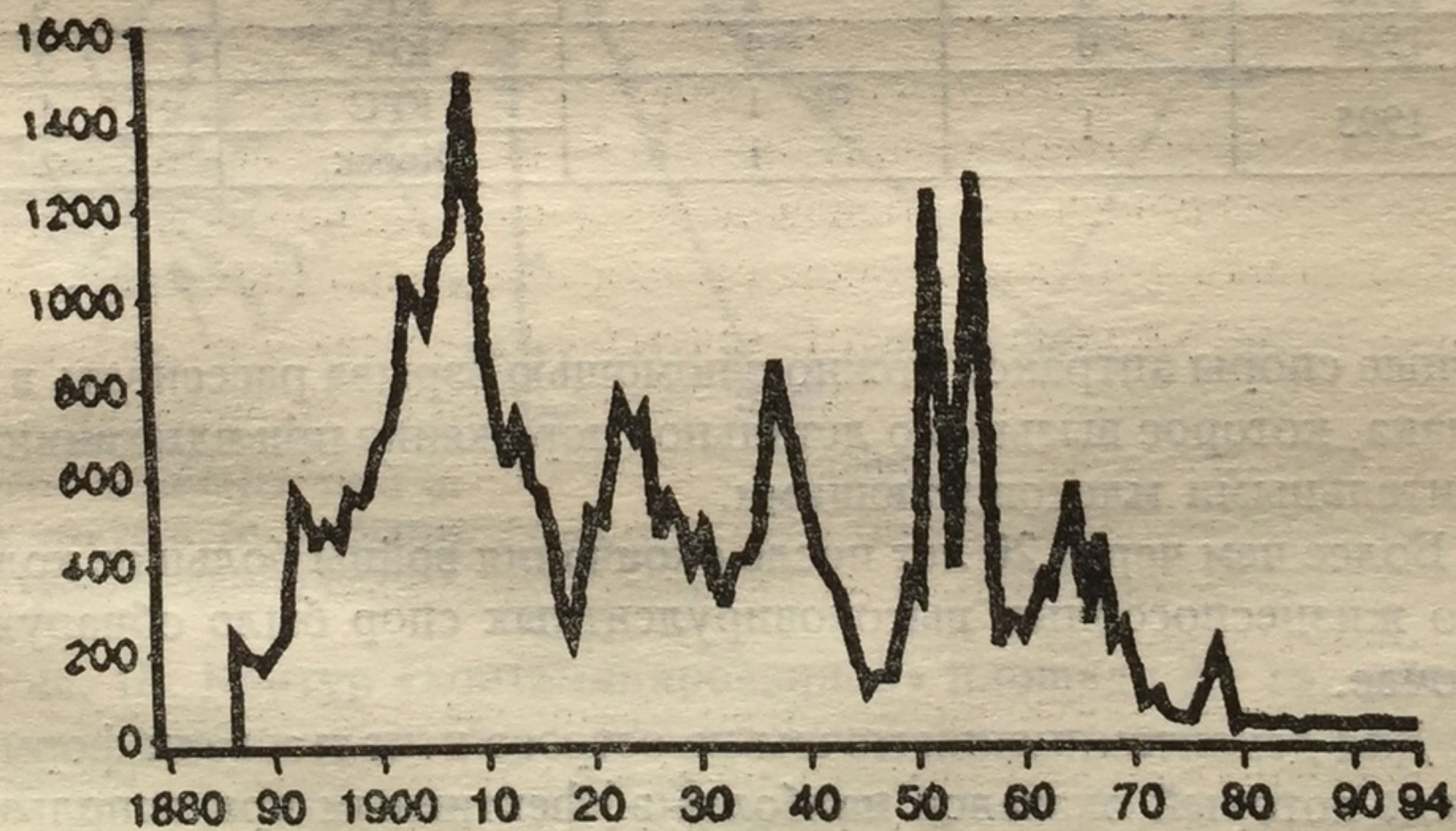


Рис. 17. Случаи антракса у животных в Британии в 1888-1994 гг.

Таблица 11.
Случаи антракса людей и животных в Великобритании
с 1981 по 1995 гг.

Годы	Люди		Животные	
	Случаи	Инцидентность	Виды животных	Число погибших
1981	-	14	КРС	17
1982	1	14	КРС	17
			Свиньи	1
1983	2	13	КРС	13
			Свиньи	1
1984	2	9	КРС	9
1985	2	4	КРС	6
1986	-	11	КРС	12
			Овцы	2
			Лошади	1
1987	1	6	КРС	6
1988	2	3	КРС	3
1989	1	3	КРС	3
		1	Свиньи	19
1990	3	5	КРС	6
1991	1	2	КРС	2
1992	1	2	КРС	2
1993	0	2	КРС	5
1994	0	3	КРС	5
1995	1	1	КРС	1
		1	Хорек	2

собные споры антракса можно с помощью взрыва рассеивать в виде облака, которое вызывало летальное поражение при вдыхании чувствительными млекопитающими.

Более чем через 20 лет после окончания войны большое количество жизнеспособных высоковирулентных спор было обнаружено в почве.

Для деконтаминации почвы на острове использовали формальдегид, который оказался наиболее эффективным при использовании 5%-ного раствора формальдегида из расчета 50 литров/кв.м.

В 1986 году провели деконтаминацию почвы с предварительным сжиганием растительности. Формальдегид растворяли в морской воде. Через 2 месяца были взяты и проанализированы пробы почвы. В 9 местах обнаружили споры возбудителя. Эти участки были по-

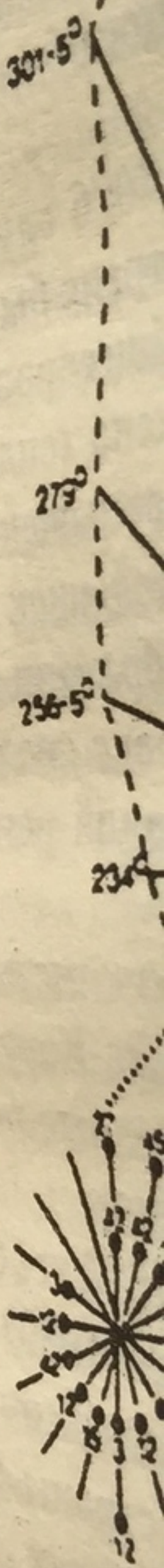


Рис. 18
Подобный на
подсчетов в ра
точки выпуска
среду (увеличе

Рис. 18
вающий на
ки. В тех
расположе
мого паде
тельные по
ко всему с
заштрихов

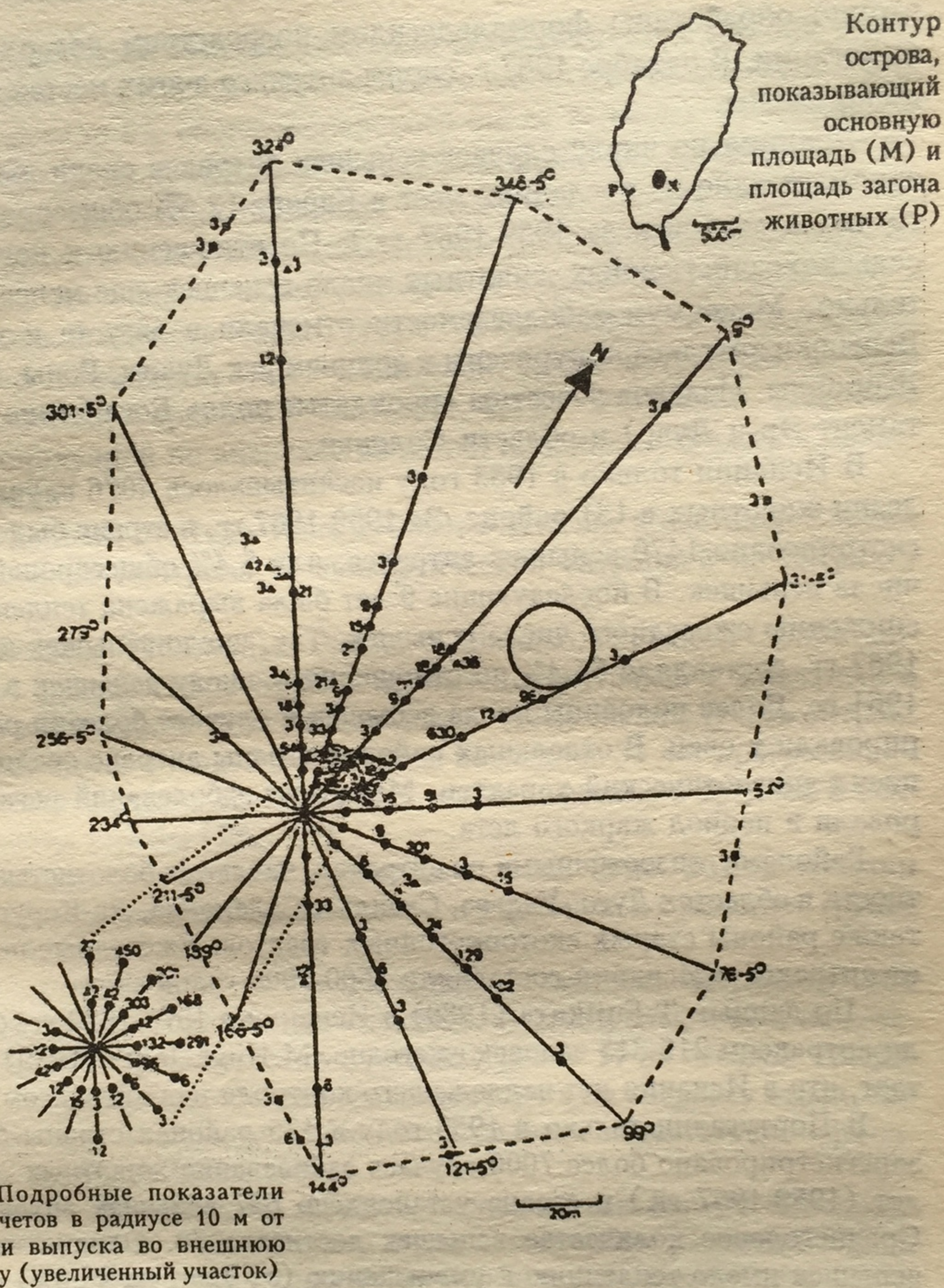


Рис. 18. Контур «контаминированной» площади 3,7 га, показывающий наиболее сильно контаминированные пункты до обработки. В тех же пунктах после обработки брали образцы. Круг, расположенный в сегменте 9°-31,5° диаметром 20 м от предполагаемого падения авиабомбы. Вставленная карта показывает относительные позиции и размеры обработанных площадей по отношению ко всему острову. Мелкомасштабные испытания были ограничены заштрихованной зоной.

вторно обработаны формальдегидом посредством поверхностной ирригации. В октябре 1987 г. споры антракса в этих местах не были обнаружены.

Франция по числу случаев-вспышек антракса среди животных занимает одно из последних мест в Европе (2,5% общеевропейского числа вспышек за 1959-1967 гг.). По отношению к поголовью сельскохозяйственных животных число вспышек еще менее значительно. Максимум заболеваемости отмечали в августе и январе. Вспышки антракса приурочены к долинам рек Луары, Роны, Сены и Жиронды. Издавна известны «проклятые поля» Боса (ныне департамент Эр и Луар) и области Солоньи.

В Испании только в 1953 году насчитывалось 4076 случаев болезни животных в 131 районе. За 1959-1967 гг. в стране было зарегистрировано 1470 вспышек антракса, или 5,4% общеевропейского числа вспышек. В последующие 9 лет была выражена тенденция к снижению ежегодного числа вспышек. Так, число вспышек в 1965-1967 гг. составляло 35,4% по отношению к числу вспышек в 1959-1961 гг. Более половины числа вспышек и случаев болезни регистрировали у овец. В отдельных районах страны антракс среди овец носил эпизоотический характер. Максимум заболеваний регистрировали в период жаркого лета.

Районами, энзоотичными по антраксу, являются болотистые местности в областях Луго, Уэльва, Севилья, Саламанка, Ла-Корунья, а также районы старых скотопрогонных трактов. Ежегодные потери от антракса в Испании составляли 1500-2000 голов скота.

По данным Т. Fujikura (1989), в Испании в 1976-1982 гг. болели антраксом 216-315 человек ежегодно. М. Hugh-Jones (1989) считает, что в Испании нет надлежащего контроля над антраксом.

В Португалии только в 1953 году в 175 районах страны было зарегистрировано более 7000 случаев заболевания животных. За 9 лет (1959-1967 гг.) в стране установлено 627 вспышек антракса. Среднегодовое количество вспышек достигало 70. Однако число вспышек имело тенденцию к уменьшению (за 9 лет на 86,8%). Основное значение имеют почвенные очаги. Антракс в Португалии является энзоотичным среди овец, на втором месте стоит заболеваемость крупного рогатого скота. Наиболее неблагополучными по заболеванию районами являются провинции Браганса, Гуадра, Каштелу-Бранку, Порталегри, Элвора, прилегающие к испанской границе. Максимум заболеваемости приходится на летние месяцы. Очаги антракса приурочены к долинам и предгорьям.

На территории И
шек антракса. С 1959
что составляло 9% о
од. Несмотря на пр
носительно невысок
сти антраксом. Ма
сентябре. Из обще
исторической обла
10,3% - в Ломбарди
- в Калибрии, Сар
неблагополучной п
ти Апулия.

По данным М.
надлежащего конт
нет.

А. Bozzano, F. C
сывают тренды (т
людей в последни
са у животных и
снижается, болез
ной частях стран

Большинство
чаще наблюдаются
от 20 до 60 лет.

По данным М.
свиней. Широко
ре страны - сре
остается в числе
контроль за рас
тивен (М. Hugh-

Таким образо
тура по уровню
болеющих жив
в Центральной
ского ареала пр
Европы в пред
ные и степные т

На территории Италии ежегодно регистрируется 150-350 вспышек антракса. С 1959 по 1967 гг. общее число очагов достигло 2440, что составляло 9% общеевропейского числа вспышек за этот период. Несмотря на профилактические мероприятия, наблюдалась относительно невысокая тенденция к снижению уровня заболеваемости антраксом. Максимум заболеваний регистрировали в августе-сентябре. Из общего числа вспышек в стране 21,1% отмечено в исторической области Лацио, 17,4% – в Кампании, 12% – в Апулии, 10,3% – в Ломбардии, 5,9% – в Сицилии, 4,6% – в Лукании, по 4,5% – в Калибрии, Сардинии и Пьемонте, 4,4% – в Венеции. Наиболее неблагоприятной по антраксу является провинция Фоджа в области Апулия.

По данным М. Hugh-Jones (1989), в Италии в настоящее время надлежащего контроля за эпизоотической ситуацией по антраксу нет.

А. Bozzano, F. Cichini, C. Pistoia, S. Giuliano, R. Fishetti (1989) описывают тренды (тенденции) в проявлении антракса у животных и людей в последние 30 лет наблюдения. Хотя число случаев антракса у животных и людей в Италии за последние 30 лет прогрессивно снижается, болезнь все еще имеет место, особенно в средней и южной частях страны (Рис. 19).

Большинство случаев происходит летом (Рис. 20). У мужчин чаще наблюдаются случаи болезни, чем у женщин, в возрастной группе от 20 до 60 лет.

По данным МЭБ, в Греции в 1953 г. заболело антраксом 1080 свиней. Широко регистрируется болезнь среди овец и коз; на севере страны – среди крупного рогатого скота. И на сегодня Греция остается в числе наиболее неблагоприятных по антраксу стран, где контроль за распространением этой болезни недостаточно эффективен (М. Hugh-Jones, 1989).

Таким образом, ареал антракса охватывает всю Европу. Его структура по уровню пораженности имеет характерные различия. Среди болеющих животных в Средиземноморской зоне преобладают овцы, в Центральной Европе – крупный рогатый скот. Оптимум европейского ареала приходится на южную часть Европы. На территории Европы в пределах ареала болезни определяются тундровые, лесные и степные типы очагов (И.А. Бакулов, М.Г. Таршис, 1971).

В дореволюции
пространенных и
но погибало огром
возникали массов
ропейской части
животных, в 187
году в одном из
овец. На кажды
лось в среднем с
ление в Р

Введение в Р
(1883) несколько
однако и в посл
зоотии и эпидем
1900-1912 гг. в
60000 голов ске
случаев сибир
(Табл.12).

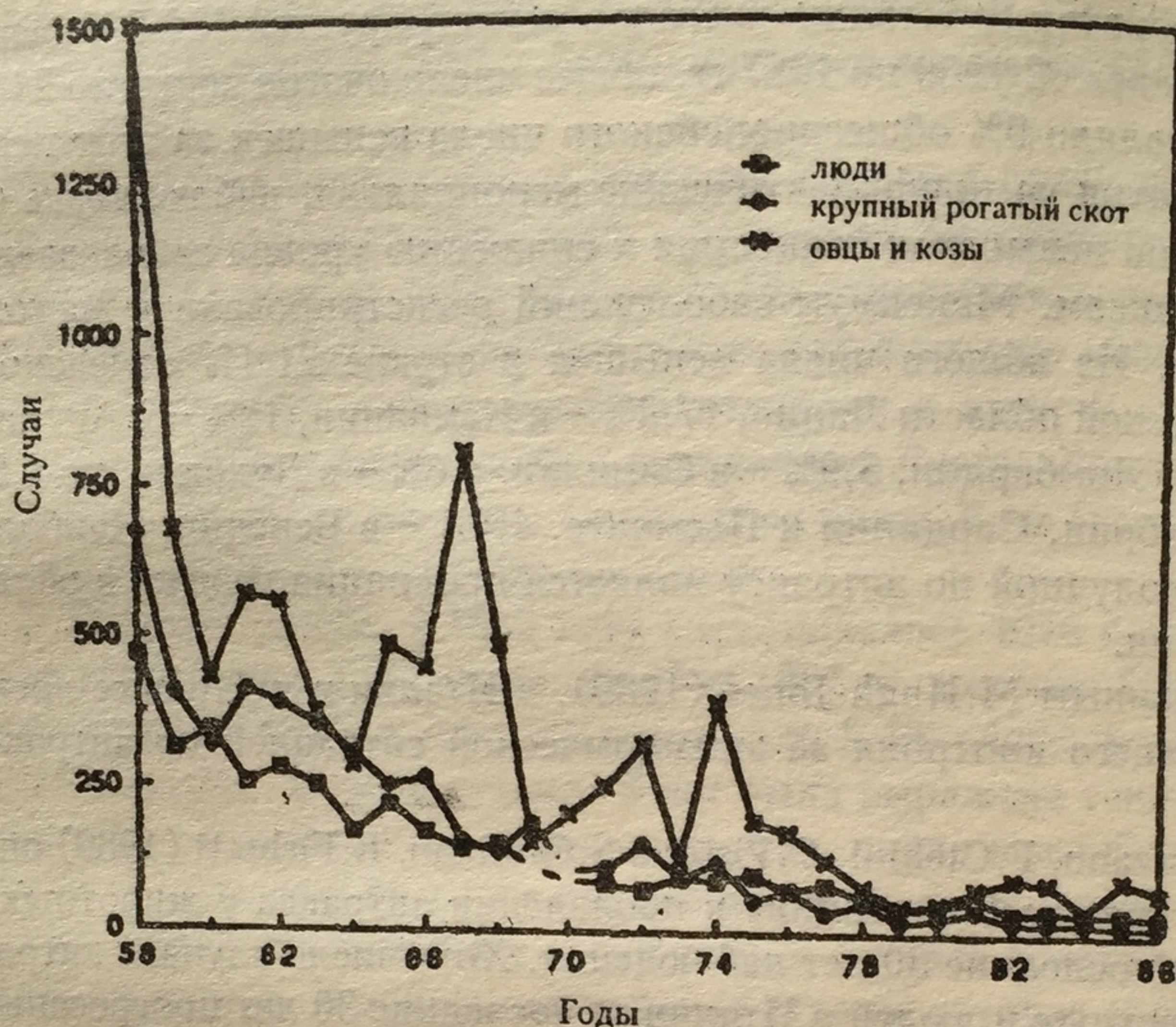


Рис. 19. Случаи антракса у животных и людей, зарегистрированные в Италии (1958-1986 гг.)

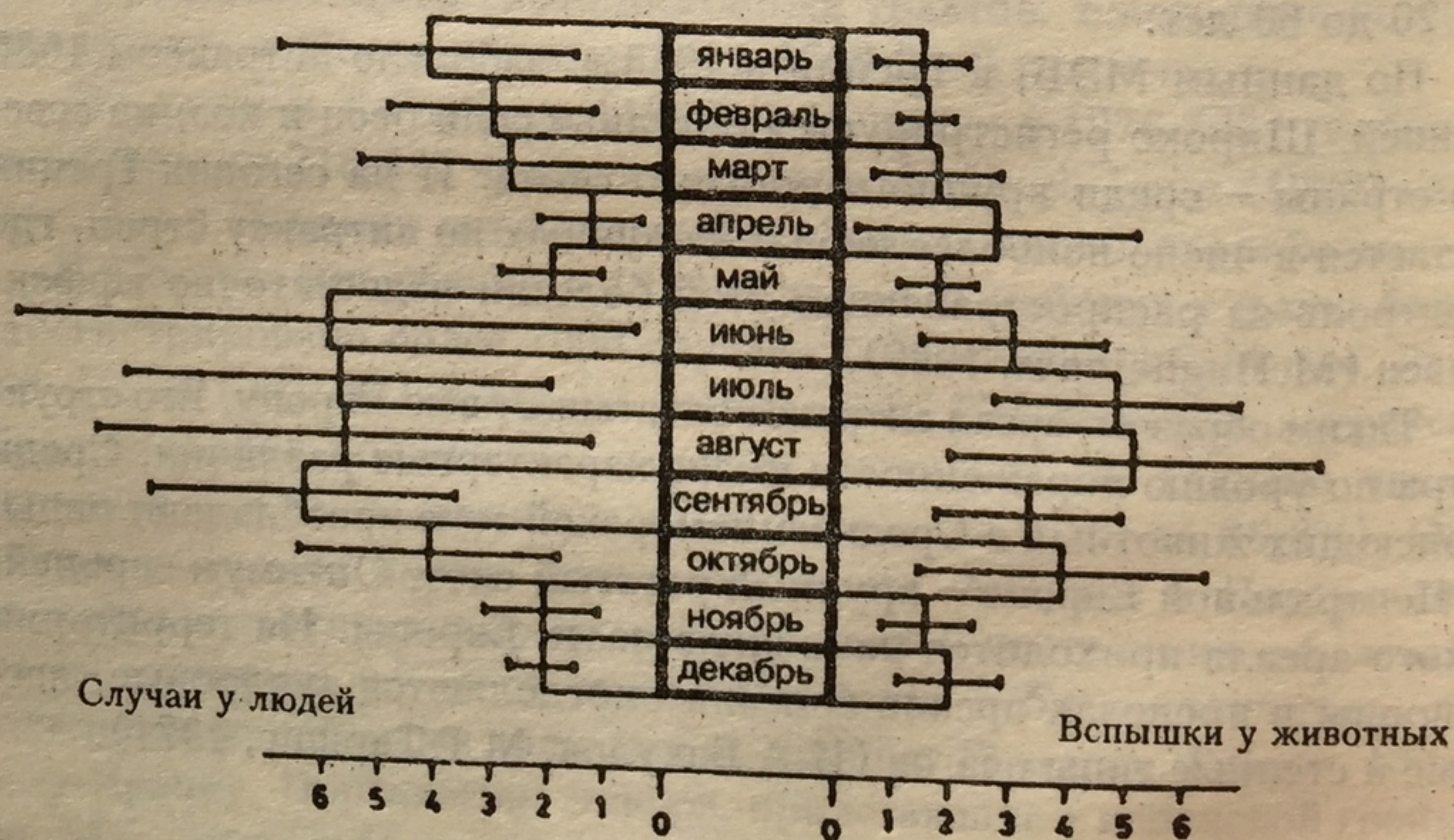


Рис. 20. Сезонность случаев антракса у людей и вспышек у животных в Италии (1978-1986 гг.)

Год	190
Число больных животных (в тыс.)	46,

Следует, с
характеризую
сии. По данн
земельской,
пало от сибир
в 1911 г. —
пало от сибир
В 57 из 6
валась средн
с 1896 по 19
25%.

По далек
нистерства
левало сиб

РОССИЯ

В дореволюционной России сибирская язва была одной из распространенных и опасных инфекционных болезней. От нее ежегодно погибало огромное количество сельскохозяйственных животных, возникали массовые заболевания людей. В 1864 году только в Европейской части России от сибирской язвы погибло свыше 90000 животных, в 1875 году в Сибири — около 100000 лошадей, в 1879 году в одном из овцеводческих хозяйств южной России — 125000 овец. На каждые 10000 случаев заболеваний животных приходилось в среднем около 200 случаев сибирской язвы среди людей.

Введение в России вакцинации животных против сибирской язвы (1883) несколько снизило потери скота и заболеваемость людей, однако и в последующие годы в стране наблюдались огромные эпизоотии и эпидемии этой болезни. По данным Н.А.Михина (1942), в 1900-1912 гг. в России ежегодно заболевало сибирской язвой 40000-60000 голов скота, а всего за этот период зарегистрировано 623500 случаев сибирской язвы среди сельскохозяйственных животных (Табл.12).

Таблица 12.
Заболеваемость животных сибирской язвой
в России в 1900-1912 гг.

Год	1900	1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	1909	1910	1911	1912
Число больных животных (в тыс.)	46,6	67,7	53,5	58,6	36,0	32,7	60,4	49,2	42,4	44,2	51,2	44,0	43,2

Следует, однако, иметь в виду, что подобные сведения неполно характеризуют заболеваемость животных в дореволюционной России. По данным А.Г.Ревнивых (1946), в Большеземельской, Малоземельской, Обской, Таймырской и Енисейской тундрах в 1896 году пало от сибирской язвы 100000 оленей, в 1897 и 1907 гг. — по 200000, в 1911 г. — 210000 и т.д. За период с 1848 по 1917 гг. в тундрах пало от сибирской язвы 1514500 оленей.

В 57 из 60 губерний царской России сибирская язва регистрировалась среди людей. По свидетельству Н.Н.Мари (1916), в России с 1896 по 1913 гг. болело 268000 человек, из которых умерло около 25%.

По далеко не полным данным медицинского департамента Министерства внутренних дел, в 1900-1914 гг. в России ежегодно заболевало сибирской язвой 15000-20000 человек (Табл.13).

Таблица 13.
Заболеваемость людей сибирской язвой в России
в 1900-1914 гг.

Год	1900	1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	1909	1910	1911	1912	1913	1914
Число больных людей (в тыс.)	11,6	13,9	15,8	17,5	13,9	14,3	18,0	18,1	17,3	19,8	17,8	17,0	15,5	15,2	14,7

Противосибиреязвенные меры, предпринимавшиеся правительством, были крайне недостаточными. Местные власти издавали постановления по борьбе с сибирской язвой от случая к случаю, обычно лишь в разгар массовых эпизоотий. Эти постановления проводились в жизнь с большим опозданием и выполнялись плохо. Нищета и невежество населения благоприятствовали распространению сибирской язвы. Крестьяне часто держали скот в жилищах, и это способствовало их заражению от больных животных. Трупы павших животных оставляли на пастбищах, что вело к возникновению стационарно неблагополучных территорий. Несоблюдение элементарных норм охраны труда и личной гигиены на предприятиях по переработке животного сырья вызывало массовые профессионально-индустриальные заражения сибирской язвой. В.Святловский в 1891 году писал: «В России сибирская язва существует постоянно. Это наша своего рода национальная болезнь...».

За годы Советской власти положение с сибирской язвой в СССР изменилось (Табл. 14).

В 1966 году уровень заболеваемости людей сибирской язвой снизился по сравнению с 1913 г. в 21,5 раза, а по сравнению с 1950 г. — в 2,5 раза (П.Н.Бургасов, 1968).

По данным И.А.Бакулова, В.А.Ведерникова, В.А.Гаврилова, В.В.Селиверстова (1999), в настоящее время благодаря успехам науки и работе практических специалистов на местах сибирская язва в России встречается в виде спорадических случаев или небольших вспышек.

Проведенный анализ, результаты которого отражает рис. 21, позволяет утверждать, что в последние годы эпизоотическая ситуация по сибирской язве заметно улучшилась. Число возникавших вспышек болезни сократилось с 676 в 1956 г. до 52 в 1991 г., до 30 — в 1994 г., до 26 — в 1996 г. За 1997 год был выявлен лишь 21 эпизоотический очаг, за 1998 год — 26, за 1999 г. — 21 очаг.

По данным статистики за 1991-1999 гг. нами (А.В.Книзе, И.А.Бакулов, Н.А.Яременко) составлена карта распространения сибирской язвы в Российской Федерации (Рис. 22).

Год	зарегистр забол
	всего
1950	1806
1951	1708
1952	1575
1953	1279
1954	1236
1955	1306
1956	1184
1957	1293

Таким образом, к концу 1950-х годов эпизоотическая ситуация по сибирской язве в СССР существенно улучшилась. Это способствовало созданию эффективной системы профилактики, которая создана на основе работы против сибирской язвы в ВНИИВБ, которая концентрирует усилия против сибирской язвы и клостридиозов в Каспийском зооветеринарном институте. Разработаны методы и препараты для профилактики и лечения болезни, работа по совершенствованию правил

Таблица 14.
Заболееваемость населения СССР сибирской язвой

Год	Число зарегистрированных заболеваний		Год	Число зарегистрированных заболеваний	
	всего	на 100000 населения		всего	на 100000 населения
1950	1806	1,0	1958	942	0,45
1951	1708	0,93	1959	1016	0,48
1952	1575	0,84	1960	755	0,35
1953	1279	0,67	1961	877	0,40
1954	1236	0,64	1962	846	0,38
1955	1306	0,66	1963	750	0,33
1956	1184	0,59	1964	607	0,27
1957	1293	0,63	1965	673	0,29
			1966	944	0,40

Таким образом, налицо явно выраженная тенденция к улучшению эпизоотической обстановки по сибирской язве в России. Этому способствовало внедрение в практику высокоэффективной вакцины против сибирской язвы животных из штамма 55-ВНИИВВиМ, которая создана в нескольких вариантах: лиофилизированная, жидкая, концентрированная и суперконцентрированная, ассоциированная против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула (разработана ВНИИВВиМ и ВГНКИ), ассоциированная против сибирской язвы и клостридиозов овец (разработана ВНИИВВиМ и Прикаспийским зональным НИВИ), ассоциированная против сибирской язвы и ящура типов А, О. Эффективность применения вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ наглядно показана в табл. 15.

Разработаны и предложены практике новые диагностические методы и препараты: новый сибиреязвенный бактериофаг, твердофазный иммуноферментный метод, реакция непрямой гемагглютинации и др. Предложен эффективный комплекс антибиотиков для лечения больных сибирской язвой животных. Ведется постоянная работа по совершенствованию системы профилактики и борьбы с этой болезнью, в 1996 году изданы совместные медико-ветеринарные правила.

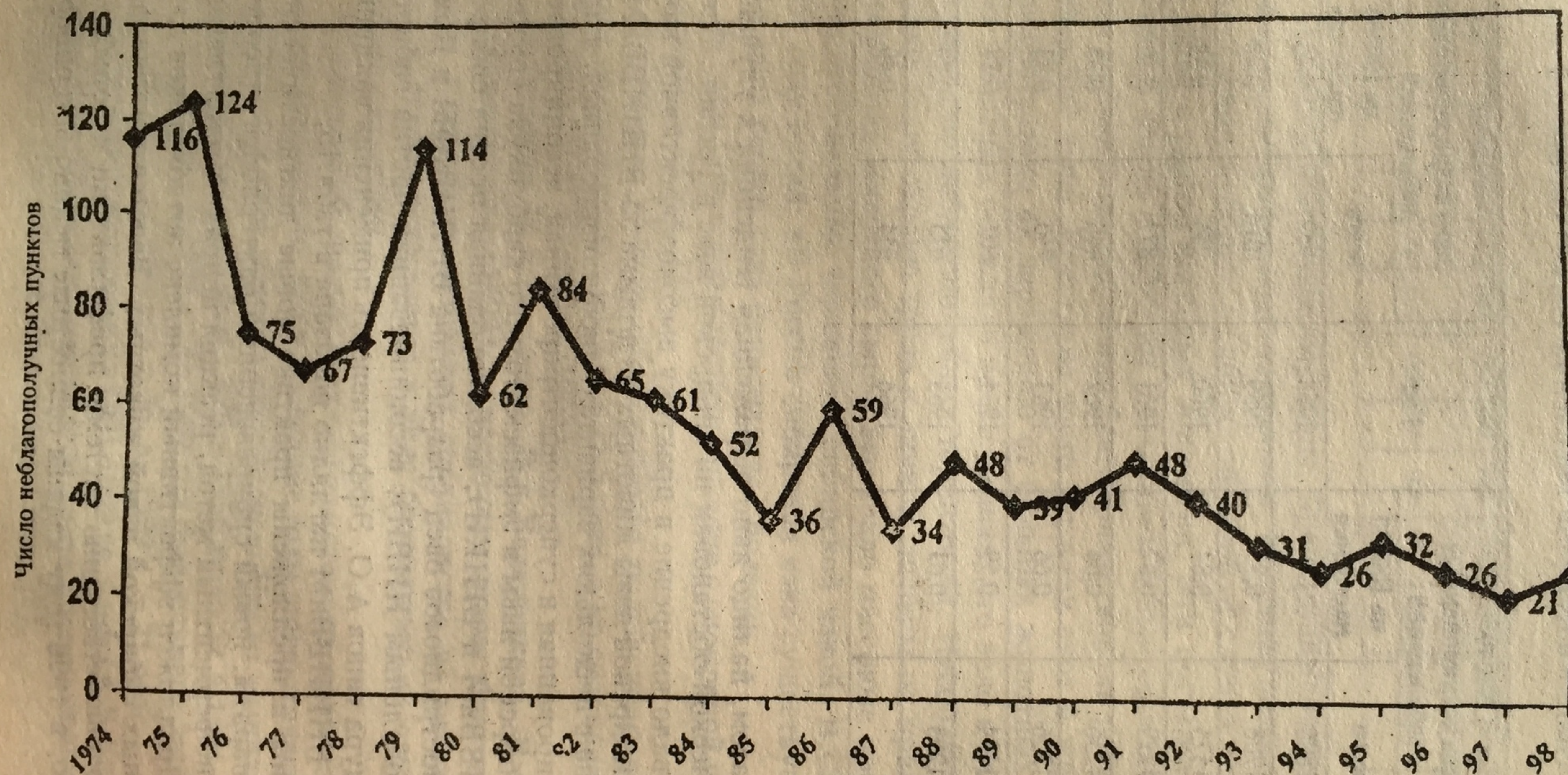


Рис. 21. Динамика возникновения неблагоприятных пунктов по сибирской язве в России с 1974 по 1999 гг.

Рис. 22. Сибирская язва в Российской Федерации (1991-1999 гг.)

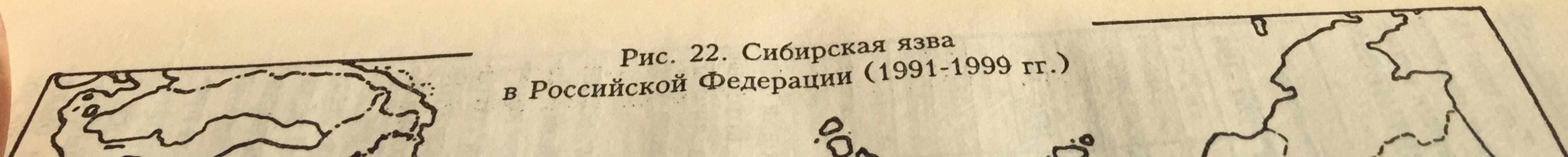


Рис. 22. Сибирская язва
в Российской Федерации (1991-1999 гг.)



Масштаб 1: 30 000 000

Условные обозначения

- | | | |
|---|---|---|
| Не зарегистрирован | Умеренно превышает средний уровень (инцидентность 31-50 случаев на 1 млн. голов с.-х. животных) | Напряженность ситуации средняя (инцидентность 11-30 случаев на 1 млн. голов с.-х. животных) |
| Напряженность ситуации ниже средней (инцидентность 1-10 случаев на 1 млн. голов с.-х. животных) | Ситуация существенно превышает средний уровень (инцидентность более 51 случая на 1 млн. голов с.-х. животных) | |

Карта составлена по материалам Департамента
ветеринарии МСХ РФ

Авторы: А.В. Книзе, И.А. Бакулов, Н.А. Яременко.
«ПОКРОВ-2000»

Таблица 15.

Сравнительные показатели числа неблагополучных пунктов и заболевших животных в период до и после применения вакцины против сибирской язвы из штамма 55-ВНИИВВиМ

Вид животных	Эпизоотологические показатели	До применения	С применением	
		1979 – 1985	1986 – 1992	1993 – 1996
Крупный рогатый скот	неблагополучные пункты	338	193	94
	заболело (голов)	784	400	350
Мелкий рогатый скот	неблагополучные пункты	76	31	10
	заболело (голов)	722	362	71
		1986 – 1988	1989 – 1992	1993 – 1996
Лошади	неблагополучные пункты	7	8	7
	заболело (голов)	100	22	13
Свиньи	неблагополучные пункты	12	9	7
	заболело (голов)	45	100	14

Однако опасность ухудшения эпизоотической обстановки еще сохраняется. Это связано с ростом числа мелких ферм, которые трудно контролировать, и ростом поголовья животных на личных подворьях сельских жителей. В таких условиях очень важно учитывать все особенности эпизоотологии сибирской язвы.

Как показано в табл. 16, вспышки болезни в 1996-1997 гг. возникли в Центральном, Волго-Вятском, Центрально-Черноземном, Поволжском, Северо-Кавказском, Уральском, Западно-Сибирском и Восточно-Сибирском районах нашей страны. В то же время сохранилось благополучие Северного, Северо-Западного и Дальневосточного районов. Есть основания говорить о смещении территориальной приуроченности вспышек сибирской язвы с севера на юг. За указанные годы наибольшее число эпизоотических очагов было выявлено в Воронежской, Курской, Саратовской, Ульяновской областях, в Алтайском крае и Башкортостане. Почти все территории особо высокого риска заражения животных находятся в степной или лесостепной зоне в местностях, которые характеризуются преобладанием черноземов разных подтипов. Перечень таких территорий фактически не меняется. Это связано, как уже указывалось, с уникальной способностью возбудителя болезни десятилетиями сохраняться в виде спор в почве тех мест, где погибли или были захоронены павшие от сибирской язвы животные. Эти места не во

Территория
РОССИЯ
Северный район
Северо-Западный р-н
Центральный р-н
Орловская обл.
Волго-Вятский р-н
Нижегородская обл.
Центрально-Черноземный р-н
Белгородская обл.
Воронежская обл.
Курская обл.
Липецкая обл.
Поволжский р-н
Самарская обл.
Пензенская обл.
Саратовская обл.
Ульяновская обл.
Калмыкия
Северо-Кавказский район
Ставропольский край
Карачаево-Черкесская респ.
Ростовская обл.
Дагестан
Чечня
Уральский р-н
Пермская обл.
Башкортостан
Удмуртия
Западно-Сибирский район
Алтайский край
Омская обл.
Восточно-Сибирский район
Красноярский край
Читинская обл.
Тува
Дальний Восток

Данные о регистрации сибирской язвы животных
в России в 1996-1997 гг.

[illegible]

всех случаях известны и обозначены на местности. В России к настоящему времени учтено более 30 тыс. населенных пунктов, в которых регистрировали гибель животных от сибирской язвы. Но в изданных кадастрах указаны лишь населенные пункты или хозяйства, где были случаи болезни, а не конкретные места гибели или захоронения животных. Поэтому при выполнении всякого рода земляных работ бывают случаи, когда наталкиваются на сибиреязвенные могилы, в результате чего заражаются животные и люди. Иногда вскрытие сибиреязвенных скотомогильников происходит в результате оползней, разливов рек.

Почвенные сибиреязвенные очаги чрезвычайно трудно обезвреживать, хотя и делаются попытки их обеззараживания газами. Наличие необеззараженных почвенных очагов заставляет проводить массовую иммунизацию животных во всех ранее неблагополучных районах.

В настоящее время проводится работа по созданию нового кадастра сибиреязвенных очагов в России, который представит уточненное расположение этих очагов на местности (Б.Л.Черкасский, В.А.Ведерников, В.А.Гаврилов и др.).

Сравнительный анализ показал, что был и остается максимальным риск заражения крупного рогатого скота. На его долю в последние 3 года приходилось от 64 до 86% выявленных неблагополучных пунктов. Так, в 1997 году случаи заболевания крупного рогатого скота были выявлены в 14 эпизоотических очагах, что составляет 67% их общего числа. Значительно реже болезнь наблюдалась у овец, свиней, лошадей. Были единичные случаи поражения сибирской язвой зверей клеточного содержания (Дагестан).

Следует отметить, что случаи заболевания свиней в последние годы участились. В 1997 году сибирскую язву у свиней диагностировали в 5 неблагополучных пунктах. Это наивысший показатель за последние 7 лет (Табл. 17).

В 70-80% эпизоотических очагов случаи болезни были единичными. Однако возникали и крупные вспышки болезни, что привело к росту коэффициента очаговости с 1,5 в 1994 г. до 8,5 в 1996 г.

В 1997 году в Горшеченском районе Курской области на специализированном комплексе заболели сибирской язвой 22 бычка, находившихся на откорме. В Дагестане в совхозе «Акушинский» заболели 11, а в Удмуртии в колхозе «Родина» — 18 коров. Явно сказываются пробелы в сведениях о наличии и локализации почвенных очагов сибирской язвы, что приобретает особую важность при проведении земляных работ. Не меньшее значение имеют за-

Показатели	
Выявлено неблагополучных пунктов	
Заболело животных	
Число заболевших в расчете на один неблагополучный пункт	
Процентное распределение неблагополучных пунктов по видам животных	
Процентное распределение заболевших животных по видам	

держки в пост
статочный ко
нарно неблаго

Наибольш
мая по сентя
язвы в зимне
сравнить хар
ных по сибир
ние показыва
августе-сентя
явно возрасл
не-зимний с
выявленных
показатели
ные» случа
Подтвер
ской язвы
данным за
Абсолют
вспышек бо
ных пункта
очагов сибир
время неко
в 1997 г.

Таблица 17.

Сводные данные о регистрации сибирской язвы животных в Российской Федерации в 1996-1997 гг.

Показатели	Всего		Крупный рог. скот		Мелкий рог. скот		Свиньи		Лошади	
	1996	1997	1996	1997	1996	1997	1996	1997	1996	1997
Выявлено неблагополучных пунктов	26	21	19	14	2	1	2	5	3	1
Заболело животных	221	75	184	66	28	1	3	7	6	1
Число заболевших в расчете на один неблагополучный пункт	8,5	3,6	9,7	4,7	14,0	1,0	1,5	1,4	2,0	1,0
Процентное распределение неблагополучных пунктов по видам животных	100	100	73,1	66,7	7,7	4,8	7,7	23,8	11,5	4,8
Процентное распределение заболевших животных по видам	100	100	83,2	88,0	12,7	1,3	1,4	6,7	2,7	1,3

держки в постановке диагноза, что и случилось в Дагестане, и недостаточный контроль за полнотой вакцинации животных в стационарно неблагополучных пунктах.

Наибольшее число вспышек болезни регистрировали в период с мая по сентябрь. Однако участились случаи вспышек сибирской язвы в зимне-весенний и осенне-зимний сезоны. Рис. 23 позволяет сравнить характер помесечной динамики выявления неблагополучных по сибирской язве пунктов в 1985-1993 и 1994-1997 гг. Сравнение показывает, что повышенный риск заражения животных в июле-августе-сентябре сохраняется и в последние годы. В то же время явно возрасла опасность вспышек болезни в зимне-весенний и осенне-зимний сезоны. В 1994-1997 гг. число эпизоотических очагов, выявленных в марте и тем более – октябре-ноябре, явно превышало показатели апреля, июня и сентября. Особенно часты «внесезонные» случаи заболевания свиней.

Подтверждением высказанного положения о сезонности сибирской язвы может служить диаграмма (Рис. 24), составленная по данным за 1996 год.

Абсолютное большинство зарегистрированных в последние годы вспышек болезни возникло в учтенных стационарно неблагополучных пунктах, причем в некоторых из них активность почвенных очагов сибирской язвы не проявлялась в течение 40-60 лет. В то же время некоторые эпизоотические очаги (в 1994 г. – 4, в 1996 г. – 6, в 1997 г. – 2) возникли в пунктах, считавшихся благополучными.

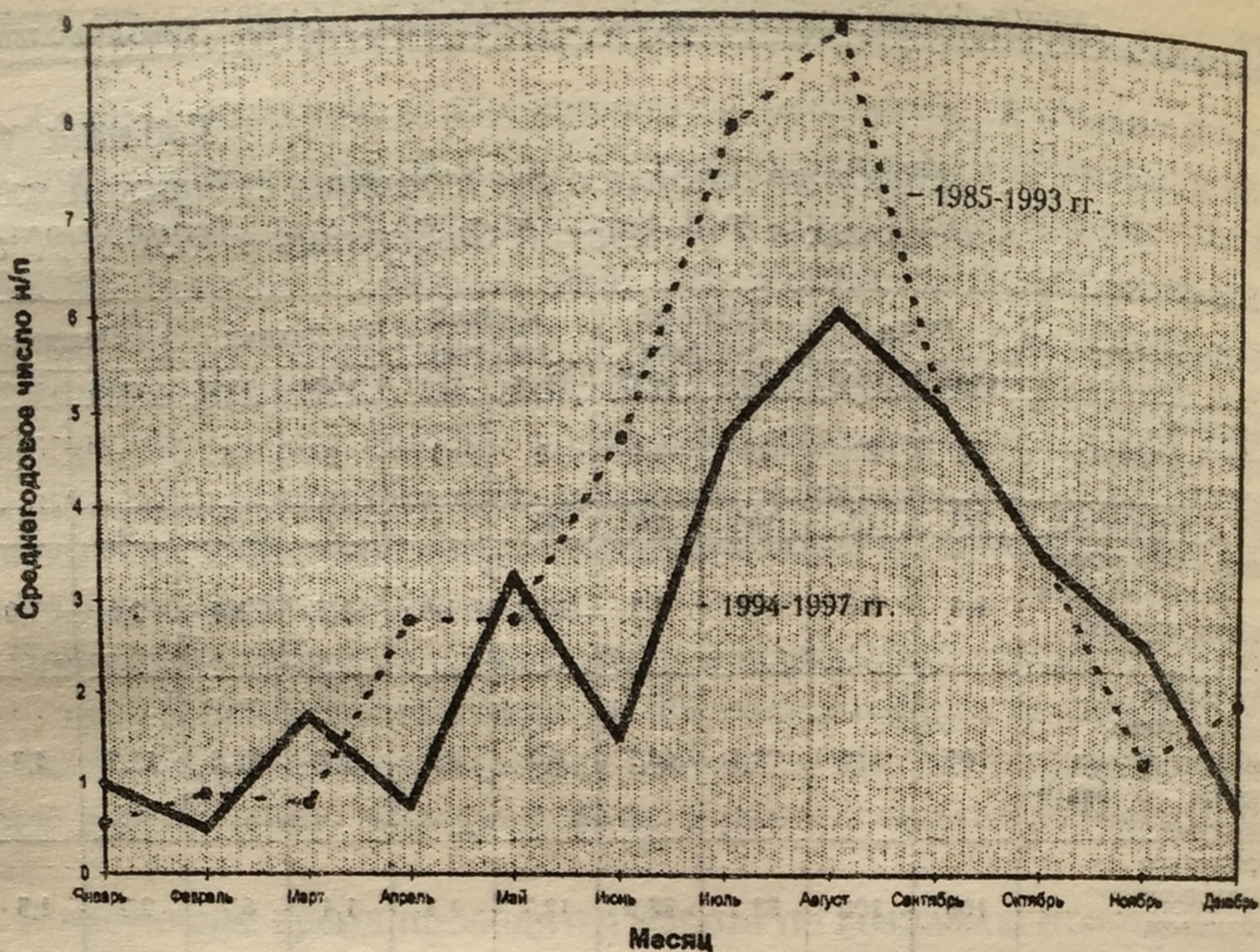


Рис. 23. Сезонная динамика возникновения пунктов, неблагополучных по сибирской язве животных, в России

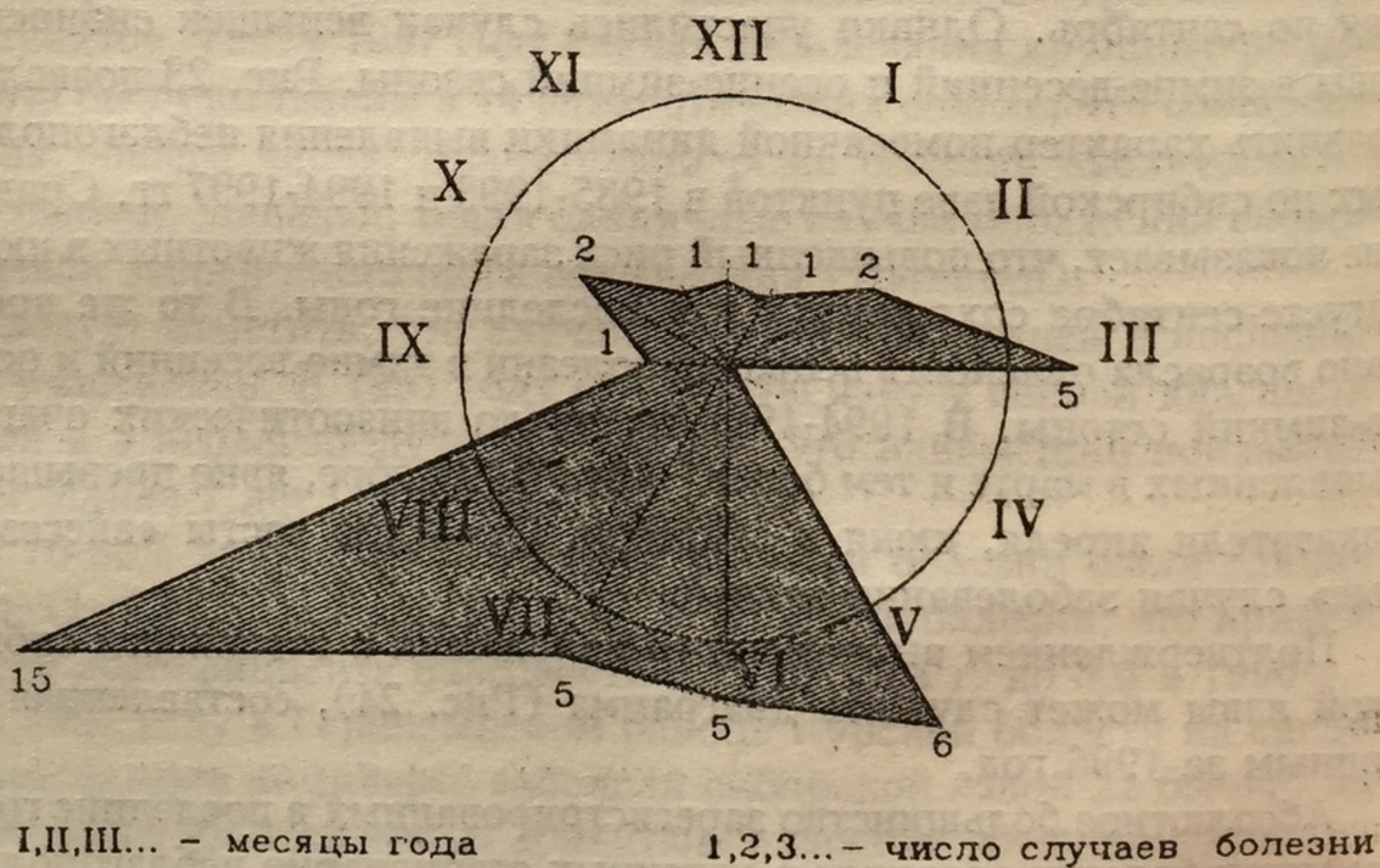


Рис. 24. Сезонность сибирской язвы животных в России в 1996 году

СИБИРСКАЯ Я...

Это доказывает, что все пункты, где в уточнения кадастра няет свою актуальность Многолетнее неблагополучных 1997 году вспышки почвенных очагов (кая область), 1953 Характерно для чаев заболевания находящийся в и вается от учета и кой язвы. Поглотится основным

Нарушение п... риятий влечет за Известно, что л... результате испол... ных. Это проис... реализацией пр... случаев вынуж... ных явно повы... из 21 выявлен... По данным... ло сибирской... чена тенденци... человек.

Соответств... место, что еш... активной про... чае не долж... животных в з... получных по... ных подворь... ка. Чрезвыч... чения возмо... вотных до... Недопустимо... у ветспециа... ность в конт...

Это доказывает, что во многих регионах страны известны далеко не все пункты, где в прошлом возникали вспышки болезни. Задача уточнения кадастров стационарно неблагополучных пунктов сохраняет свою актуальность.

Многолетнее сохранение риска заражения животных в ранее неблагополучных местностях подтверждается новыми данными. В 1997 году вспышки болезни возникали в пунктах, где активность почвенных очагов сибирской язвы не проявлялась с 1949 (Самарская область), 1953 (Алтайский край), 1958 (Удмуртия) годов.

Характерно для современного периода явное преобладание случаев заболевания животных в личных хозяйствах граждан. Скот, находящийся в их пользовании, зачастую не учитывается или укрывается от учета и, соответственно, не вакцинируется против сибирской язвы. поголовье скота на личных подворьях нарастает и становится основным контингентом риска заражения сибирской язвой.

Нарушение правил проведения противосибиреязвенных мероприятий влечет за собой заражение не только животных, но и людей. Известно, что люди чаще всего заражаются сибирской язвой в результате использования в пищу мяса вынужденно убитых животных. Это происходит, если нарушен контроль за убоем животных и реализацией продуктов уоя. На фоне экономического спада доля случаев вынужденного уоя заболевших сибирской язвой животных явно повысилась. За 1997 год такие случаи имели место в 11 из 21 выявленного эпизоотического очага.

По данным Госкомсанэпиднадзора РФ, за 1992-1995 гг. заболело сибирской язвой в России 174 человека (Табл. 18). Однако отмечена тенденция снижения числа заболевших по годам с 55 до 30-34 человек.

Соответственно, опасность заражения людей продолжает иметь место, что еще раз подчеркивает необходимость и обязательность активной профилактики этой болезни у животных. Ни в коем случае не должны снижаться объемы профилактической вакцинации животных в зонах особого риска заражения, в стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктах. поголовье животных в личных подворьях следует рассматривать, как контингент особого риска. Чрезвычайную социальную важность приобрела задача исключения возможности использования мяса вынужденно убитых животных до получения результатов лабораторного исследования. Недопустимо затягивание постановки диагноза на сибирскую язву. У ветспециалистов на местах должна быть постоянная настороженность в контроле за вынужденным убоем.

Таблица 18.

65

случаев
1989 г.), Инд
0,05).
следует ос
в Респу

сибирской языке
разный по природно
регион России со свои
кими особенностями. С
В.С.Карпова, В.Ф.Чер
Местные якутские

ва «сотор» - все сметается, плохо держится, распространяется болезнями и т.п.).

Первые сведения
носятся к 1811 году
8 голов крупного
1993-1994 гг., т.е.
рвали заболеван
например, в 1861
голов скота; в Ко
язвы уничтожила
ездовых собак (

Самой больш
ской язвы до 19
жила 7326 голо
Науч

Наиболее сложная разруха, в Якутии переживаниями и переездами АССР был не период зарегистрированность болезней - по 1

- по 1 разу
- по 2 раза
- по 3 раза
- по 4 раза
- по 5 раз
- по 6 раз

В 1981-1990 гг. в России регистрировали ежегодно в среднем 48 случаев сибирской язвы у людей (колебания от 72 в 1983 г. до 16 в 1989 г.). Инцидентность составила 0,05 (с колебаниями от 0,01 до 0,05).

Отдельно следует остановиться на эпизоотической ситуации по сибирской язве в Республике Саха (Якутия). Это весьма своеобразный по природно-климатическим и экономическим условиям регион России со своими эпидемиологическими и эпизоотологическими особенностями. С этой целью мы воспользуемся монографией В.С.Карпова, В.Ф.Чернявского, Т.Д.Каратаевой (1997).

Местные якутские названия сибирской язвы – «сотуун» (от русского слова «шатун», т.е. животное шатается, или от якутского слова «сотор» – все сметает, поголовно истребляет), «байсаттар» (шатается, плохо держится на ногах), «салгын ыарыыта» (быстро распространяется болезнь, возможно кровососущими насекомыми, птицами и т.п.).

Первые сведения о возникновении сибирской язвы в Якутии относятся к 1811 году, когда в Колымском округе пало 175 лошадей и 8 голов крупного рогатого скота. В последующие годы, вплоть до 1993-1994 гг., т.е. в течение более 100 лет, почти ежегодно регистрировали заболевание и гибель животных от сибирской язвы. Так, например, в 1861 году по Вилюйскому округу пало около 2 тыс. голов скота; в Колымском округе в 1888 году эпизоотия сибирской язвы уничтожила 34% крупного рогатого скота, 60% лошадей, 96% ездовых собак (от поедания валявшихся трупов), 21% оленей.

Самой большой из числа зарегистрированных эпизоотий сибирской язвы до 1917 года была эпизоотия 1884 года, которая уничтожила 7326 голов разных видов животных.

Наиболее сложная эпизоотическая ситуация по сибирской язве в Якутии сложилась в 1909-1941 гг. (гражданская война, послевоенная разруха, сплошная коллективизация с массовыми перемещениями и перегруппировками скота и др.). К 1940 году по Якутской АССР был неблагополучным по сибирской язве 21 район. За этот период зарегистрировано 240 неблагополучных пунктов. Повторяемость болезни в них выразилась следующими показателями:

- по 1 разу в 164 пунктах (59,2% от общего числа);
- по 2 раза в 46 - " - (16,6% - " -);
- по 3 раза в 19 - " - (6,9% - " -);
- по 4 раза в 16 - " - (5,8% - " -);
- по 5 раз в 8 - " - (2,9% - " -);
- по 6 раз в 7 - " - (2,5% - " -);

- по 7 раз в 6 - " - (2,1% - " -);
- по 8 раз в 5 - " - (1,8% - " -);
- по 10 раз в 3 - " - (1,1% - " -);
- по 11 раз в 3 - " - (1,1% - " -).

С 1940 по 1945 гг. спорадические случаи сибирской язвы регистрировали в 12 районах. В 1946-1957 гг. эпизоотическая ситуация по сибирской язве в Якутии оставалась сложной. Например, в Жиганском районе эпизоотия этой болезни в 1949 году уничтожила 1634 оленя, 1 лошадь и 1 корову. Наиболее неблагоприятным за этот период был 1957 год, когда сибирская язва распространилась в 5 районах.

Затем в течение 11 лет (1958-1969) сибирскую язву домашних и диких животных на территории Якутии почти не регистрировали.

В 1969-1978 гг. эпизоотии сибирской язвы регистрировали у оленей, в дикой фауне и у крупного рогатого скота. Крупная эпизоотия болезни у северных оленей вспыхнула летом 1969 года в Оленекском районе - в 9 пунктах пало 892 оленя. В 1970 году эпизоотия продолжалась среди диких таежных животных на территории Якутской АССР и Красноярского края, при этом были найдены и уничтожены трупы 73 диких оленей, 11 лосей, 3 медведей, 1 лошади.

В последующие 9 лет случаев заболевания домашних животных сибирской язвой не отмечалось, хотя охотники сообщали о найденных трупах диких животных.

В 1980 году в Жиганском районе пали 345 оленей.

Небольшие эпизоотии и спорадические случаи заболевания диких и домашних животных сибирской язвой продолжались в 1986-1988 гг.

Последняя зарегистрированная эпизоотия сибирской язвы на территории Республики Саха (Якутия) была отмечена в 1993 году - в Мирнинском районе было 19 неблагоприятных пунктов, из них в 16 болели дикие животные. Всего обнаружено 52 трупа (28 домашних и 8 диких оленей, 11 лосей, 2 лошади, 1 жеребенок, 1 медведь, 1 косуля). Из отобранного патматериала в 28 случаях выделен возбудитель сибирской язвы.

По уровню инцидентности и степени неблагоприятия по сибирской язве территория Республики Саха (Якутия) разделена на 4 эпизоотологические зоны (Рис. 25):

1) Зона высокого уровня инцидентности и неблагоприятия: Якутский, Чурапчинский, Верхневиллюйский, Виллюйский, Нюрбинский и Среднеколымский районы, в которых за изучаемый период эпизоотии сибирской язвы регистрировали от 9 до 11 раз;

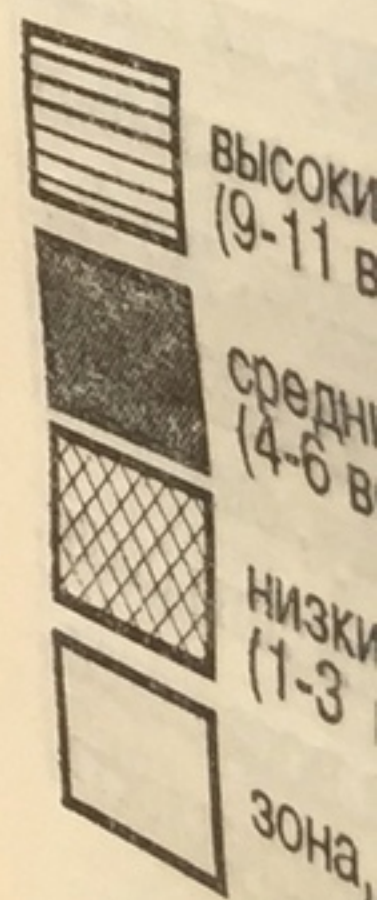


Рис. 25. Зоны сибирской язвы



Рис. 25. Уровень инцидентности и степень неблагополучия по сибирской язве территории Республики Саха (Якутия) за 1918-1996 гг.

2) Зона со средним уровнем инцидентности и неблагополучия: Оймяконский, Намский, Хангаласский, Лекминский, Горный, Амгинский, Оленекский и Сунтарский районы, в которых болезнь отмечали от 4 до 6 раз;

3) Зона с низким уровнем инцидентности и неблагополучия: Алданский, Жиганский, Кобяский, Томпонский, Таттинский, Верхоянский, Мегино-Кангаласский, Мирнинский, Усть-Алданский, Момский и Усть-Майский районы, где эпизоотии сибирской язвы наблюдали от 1 до 3 раз за изучаемый период;

4) Зона, свободная от сибирской язвы: тундровые районы Заполярья Якутии. Особняком стоят Нерюнгринский (бывший Тимптонский) и Ленский районы, где сибирская язва не регистрировалась ни разу.

За более чем 80-летний период наблюдения сибирская язва обнаружена у животных 9 видов: крупный рогатый скот, домашние и дикие олени, лошади, свиньи, косули, лоси, медведи и собаки. Особенно чувствительны к этой болезни северные олени. У них отмечали острое течение, на вскрытии — значительные поражения легких, остальные внутренние органы и лимфатические узлы без видимых изменений. Выделенные культуры *Vac. anthracis* имели слабо выраженную капсулу, высоко чувствительны к антибиотикам, патогенны для мышей, которые гибли на вторые сутки. У них при вскрытии обнаруживали характерные патологоанатомические изменения внутренних органов; была выделена культура возбудителя болезни.

Известный якутский писатель В. Соловьев-Болот Боотура так описывает клиническую картину сибирской язвы у оленей: «...К вечеру заболели две важенки. Они не паслись, с выпученными глазами и бессмысленным взглядом, слонялись среди других оленей стада. Больные олени слабели на глазах, стали шататься, глаза были красные, веки отекающие и выворочены. Появилась одышка, рот был открыт. Затем их стало сильно шатать, и они упали на землю. Ноги были вытянуты, головы запрокинуты назад, лежа на боку, они делали плавательные движения. Живот быстро вздувался, слышны были тяжелые стоны. Так олени мучились недолго, изо рта и носа потекла кровянистая с пеной жидкость. На теле появились припухлости багрового цвета, горячие на ощупь ...».

В результате осуществления противоэпизоотических мероприятий и ежегодной поголовной вакцинации в республике заболеваемость крупного рогатого скота и лошадей резко снизилась (Табл. 19).

Снизилась также и заболеваемость сибирской язвой людей — от крупных вспышек до единичных случаев (Табл. 20).

Виды животных
Крупный рогатый скот
Лошади
Олени
Всего:

Люди и животные
также с ин-
синальн-
листов со

Районы
Мегино-Кангаласский
Ленский
Хангаласский
Верхне-Витимский
Нюрбинский
Мирнинский
Томпонский
Горный
Жиганский
Всего:

Таблица 19.

Изменение удельного веса заболеваемости
сибирской язвой за 1936-1957 гг. и 1969-1994 гг.

Виды животных	1936 – 1957 гг.		1969 – 1994 гг.	
	Заболело голов	Удельный вес в %	Заболело голов	Удельный вес в %
Крупный рогатый скот	728	16,4	4	0,25
Лошади	864	19,4	89	4,36
Олени	2852	64,2	1950	95,4
Всего:	4444	100	2443	100

Люди заражались в основном в результате контакта с больными животными при убойе, разделке и транспортировке (86,6%), при контакте с инфицированной почвой (5,0%) и шерстью (0,7%). Профессиональная заболеваемость животноводов и ветеринарных специалистов составила 70%, владельцев скота 10%, прочего населения 15%.

Таблица 20.

Заболеваемость сибирской язвой людей в РС(Я)
за 1949-1996 гг.

Р а й о н ы	Г о д ы								
	1949	1952	1955	1956	1970	1974	1976	1980	Всего
Мегино-Кангаласский	2	-	-	-	-	-	-	-	2
Ленский	-	3	-	-	-	-	-	-	3
Хангаласский	-	-	2	1	-	-	-	-	3
Верхне-Вилуйский	-	-	1	-	-	-	-	-	1
Нюрбинский	-	-	1	-	-	-	-	-	1
Мирнинский	-	-	-	-	4	-	-	-	4
Томпонский	-	-	-	-	-	2	-	-	2
Горный	-	-	-	-	-	-	2	-	2
Жиганский	-	-	-	-	-	-	-	3	3
Всего:	2	3	4	1	4	2	2	3	21

2.2. Особенности эпизоотологии и эпидемиологии сибирской язвы (антракса) в мире и, в частности, в России в современных условиях

Трудно предположить, что болезнь, которая известна человечеству с глубокой древности, остается столь длительное время неизменной в своем проявлении. Опыт наблюдения за другими инфекциями (например, африканской чумой свиней) показывает, что с изменением условий внешней среды и экологии возбудителя болезни происходят и эволюционные изменения в характере самой болезни. Так, африканская чума свиней, переместившись из Африки в Европу и на другие континенты, поразила распространенные там виды и породы свиней, помимо имевшего место острого течения она приобрела характер хронической инфекции, а возбудитель ее заметно снизил свою вирулентность.

Очевидно возбудитель сибирской язвы за столь длительный период сосуществования с внешней средой, восприимчивыми и иммунизированными объектами (человек, млекопитающие) также изменил свой характер, а вместе с ним изменились и болезнь, ее течение, симптоматика. В этом мы сможем убедиться, проанализировав материалы наблюдений и публикаций хотя бы в пределах полутора веков — второй половины XIX века и всего XX века.

В книге «Международные и национальные аспекты современной эпидемиологии и микробиологии» (М., «Медицина», 1975) В.М.Жданов и О.В.Бароян излагают свои взгляды на эволюцию микроорганизмов и болезней человека. Ссылаясь на Ч.Дарвина, они приводят его высказывания «о многообразных и сложных процессах влияния окружающей среды (того, что сейчас принято называть экологией) на эволюционные изменения отдельных видов живых организмов». По мнению этих авторов, «внешняя среда, окружающая всю живую природу, в том числе и мир микробов (т.е. среду их обитания), является основной причиной их превращений в процессе эволюции».

Они перефразируют известную латинскую пословицу «tempora mutantur et nos mutantur in illis» («Времена меняются и мы меняемся вместе с ними») таким образом «tempora mutantur et morbi mutantur illis» («Времена меняются и вместе с ними меняются болезни»). Тем самым они еще раз подчеркивают неизбежность изменения возбудителя и болезни в ходе эволюционного процесса. Решающее значение для понимания эволюции инфекционных болезней, по их мнению, имеет применение экологического принципа и

71
СИБИРСКАЯ ЯЗВА
подхода, который ф
фекционной болезни
человеческом обще
существования. То
иногда не тысяче
пример с африкан
положение. Эволю
на наших глазах в
В книге «Эволю
«Медицина», 1984
вают эволюцию с
ется, рассматрива
возбудителя, ука
которые были хар
да почвенный ми
том, сохраняя сп

Такое же мн
паразитов прои
паразитам (меж
ца паразитизма)
паразитам».

Ну, а дальш
кращается? В.М.
роли человека
следующим об
зайственная де
возбудителя си
лезню домашн

Нам предст
будителя и са
подтверждает
ми.

Более 25 л
логии (И.А.Б
проводится р
возбудителя с
шего СССР и
ют таксономи
приводит к ди
мероприятий,

подхода, который формулируется так: «Эпидемиология любой инфекционной болезни есть прежде всего экология ее возбудителя в человеческом обществе».

Человеческое общество неразрывно связано со средой своего существования. Темпы эволюции некоторых инфекций измеряются иногда не тысячелетиями, а немногими десятилетиями. Кстати, наш пример с африканской чумой свиней как раз и подтверждает это положение. Эволюция возбудителя и болезни протекала буквально на наших глазах в течение трех десятилетий.

В книге «Эволюция возбудителей инфекционных болезней» (М., «Медицина», 1984) ее авторы В.М. Жданов и Д.К. Львов рассматривают эволюцию сибирской язвы. Однако они, как нам представляется, рассматривают лишь один период эволюции этой болезни и ее возбудителя, указывая, что «сибирская язва сохранила все черты, которые были характерны для нее многие миллионы лет назад, когда почвенный микроб эволюционировал и стал летальным паразитом, сохраняя способность образования стойких спор...»

Такое же мнение высказывает В.Ю. Литвин (1976): «Эволюция паразитов происходит от свободно живущих форм к случайным паразитам (между первыми и вторыми проходит «нижняя» граница паразитизма), затем к факультативным и, наконец, к облигатным паразитам».

Ну, а дальше что? Неужели на этом эволюционный процесс прекращается? В.М. Жданов и Д.К. Львов не признают существенной роли человека в эволюции возбудителя болезни, излагая эту мысль следующим образом: «появление человека и его общественно-хозяйственная деятельность не повлияла существенно на эволюцию возбудителя сибирской язвы, хотя эта инфекция и стала частой болезнью домашних животных».

Нам представляется, что эволюционный процесс изменения возбудителя и самой болезни происходит и в настоящее время, что подтверждается многочисленными наблюдениями и исследованиями.

Более 25 лет во ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, Н.С. Косяченко, Ю.В. Числов) проводится работа по сбору и повторной идентификации штаммов возбудителя сибирской язвы, циркулирующих на территории бывшего СССР и России. На практике не всегда правильно определяют таксономическое положение выделенных микроорганизмов, что приводит к диагностическим ошибкам и влечет за собой проведение мероприятий, неадекватных истинному положению дел. Кроме того,

только в научно-исследовательских учреждениях имеется возможность проведения сравнительных исследований с ранее выделенными штаммами, что позволяет установить изменения в характере штаммов и рекомендовать принятие соответствующих мер.

Отечественные и зарубежные литературные данные по изучению свойств штаммов возбудителя сибирской язвы довольно обширны, однако в ряде случаев они противоречивы. Некоторые авторы указывают на типичность сибиреязвенных бацилл, другие – на имеющиеся различия изучаемых штаммов (П.Н.Бургасов, Г.Н.Рожков, 1984; Н.Н.Гинсбург и др., 1975; Г.В.Дунаев, С.Г.Колесов, 1984; Д.Д.Керимов, 1978; Н.Н.Неляпин, 1978; Ю.И.Соркин, 1971; В.С.Федотов, 1978). Установлена также циркуляция в организме животных и во внешней среде бескапсульных авирулентных сибиреязвенных штаммов, сохранивших иммуногенность.

Например, при проведении земляных работ в Воронежской области был выделен сибиреязвенный штамм, сохранявший вирулентность в течение 46 лет (И.С.Лебединская и др., 1978). Оказалось, что на этом месте был падеж лошадей от сибирской язвы. В другом случае из смыва с кормушек в телятнике выделили бескапсульный сибиреязвенный штамм, причем на этой ферме случаев заболевания животных сибирской язвой не было несмотря на то, что 140 телят до 3-месячного возраста не были привиты против этого возбудителя. В связи с этим необходимо выяснить, какая роль отводится в инфекционном и эпизоотическом процессах авирулентным, но по всем другим свойствам — сибиреязвенным штаммам, как они возникают, создают ли невосприимчивость при циркуляции в неиммунных организмах, представляют ли потенциальную угрозу, возможен ли возврат их к патогенной форме и каков возможный механизм этой реверсии. Цель данной работы — исследование штаммов, выделенных в России и других странах за 25 лет.

Исследования проведены на 328 эпизоотических штаммах (из них капсульных — 292, бескапсульных — 36) и 30 вакцинных (капсульных — 11, бескапсульных — 19). Штаммы поступали в музей института с 1971 года, хотя некоторые из них были выделены значительно раньше (с 1933 года).

Наибольшее число эпизоотических капсульных штаммов выделено от вынужденно убитых и из трупов животных, павших от сибирской язвы, из кожсырья, почвы, растений и других объектов внешней среды. Большинство из них получено от крупного и мелкого рогатого скота, меньше — от лошадей, свиней, норок, кроликов. География выделенных штаммов чрезвычайно разнообразна. Чаше

эпизоотические вирулентные штаммы поступали из Северной Осетии – 49 (все они выделены от крупного рогатого скота), а также из Курской (20 штаммов), Семипалатинской (15), Свердловской (14), Курганской (7), Владимирской (4), Липецкой (3) областей, Алтайского края (10), Чувашии (6). 5 штаммов получено из Народной Республики Кубы, 3 – из Эфиопии, 1 – из Болгарии. В России, кроме перечисленных регионов, выделяли в Архангельской, Воронежской, Тульской, Белгородской, Новосибирской, Калужской, Московской, Саратовской, Оренбургской областях, в Ставропольском, Краснодарском краях, в Татарии, Удмуртии, Коми. Штаммы возбудителя выделяли также в Грузии, Литве, Казахстане, Эстонии, Туркмении, Армении, Белоруссии, Молдавии, Украине.

Из эпизоотических бескапсульных, а точнее полевых, штаммов, находящихся в музее, 12 выделено от животных при различных патологиях; 21 – из почвы скотомогильников и мест, где когда-то гибли животные от сибирской язвы; происхождение трех неизвестно. Штаммы были получены от овец (2), свиней (1), молодняка крупного рогатого скота (1), вынужденно убитого крупного рогатого скота (3), кролика (1) и из абортированных плодов коров (4). География бескапсульных штаммов, выделенных от животных: Белоруссия, Украина, Казахстан, Молдавия, Туркмения, Россия (Оренбургская, Белгородская области, Алтайский край, Северная Осетия, Удмуртия), из почвы – Большеземельская тундра Ненецкого национального округа (в 1906 году здесь был падеж оленей от сибирской язвы), Курганская, Ашхабадская и Луганская области. Все эпизоотические штаммы направили в институт для повторной идентификации. Из отечественных вакцинных штаммов изучали СТИ, ГНКИ, 55-ВНИИВВиМ, N 3-R – А.Л.Тамарина и зарубежных – 34 Ф-2 «Стерна», «Индийский», «Ихтиман», «Афганистан», «Дакар», «Пастера П2Р». В качестве референс-штамма использовали 2-ю вакцину Ценковского (штаммы М-71 и 71/12).

Изучение биологических, морфологических, культуральных, биохимических, вирулентных и иммуногенных свойств проводили по общепринятым методикам, вирулентность определяли на белых мышцах, морских свинках и кроликах. Иммуногенность вакцинных и бескапсульных сибиреязвенных штаммов, циркулирующих в природе, изучали на морских свинках массой 400-500 г, которых иммунизировали вышеуказанными штаммами одно- или двукратно (с интервалом 8 суток) в дозах 4-12 млн спор. Через 20 суток после первой иммунизации животных заражали референс-штаммом или вирулентными (№№ 1, 33, 34, 75, 76, 81, 105, ч-7) штаммами возбу-

дителя сибирской язвы. Смертельные для морских свинок дозы предварительно оттитровывали на этом виде животных. Дозировку исследуемых штаммов рассчитывали по числу жизнеспособных спор, выявляемых методом посева 10-кратных разведений суспензии спор в чашки Петри с МПА. Иммуногенность вакцинных и других штаммов определяли по индексу защищенности — отношению числа выживших иммунизированных животных в результате заражения к общему числу зараженных в данной группе животных.

Оказалось, что все эпизоотические капсульные штаммы были типичны по своим свойствам и таксономически являлись возбудителем сибирской язвы. Наблюдались лишь отдельные различия по вирулентности и некоторым культурально-морфологическим характеристикам. На МПА в основном обнаруживали колонии R- и RR-форм. Один штамм (авирулентный) образовывал колонии RO-формы. Зависимость вирулентности от формы колоний не отмечена. Наиболее вирулентными оказались 4 штамма — мышей убивала доза, содержащая одну спору возбудителя. Еще 4 штамма убивали мышей в дозе 10 спор. Остальные имели полную смертельную дозу DCL для белых мышей в пределах 10^2 , для морских свинок — 10^3 – 10^4 , для кроликов — 10^5 . Штаммы, выделенные из почвы, были вирулентны для белых мышей и морских свинок в дозе 10^5 спор.

Следовательно, независимо от источника выделения (животного или внешней среды) и от географического положения эпизоотических очагов сибиреязвенные капсульные вирулентные штаммы не различались по свойствам, типичным для возбудителя сибирской язвы, что позволяет достоверно осуществлять индикацию и идентификацию этих штаммов, определять таксономическое положение выделенных микроорганизмов и уверенно ставить диагноз на сибирскую язву.

Группа полевых, бескапсульных авирулентных сибиреязвенных штаммов заслуживает специального рассмотрения. Мы их называли полевыми. Они обнаружены не в период вспышки сибирской язвы, хотя и были выделены в хозяйствах от животных и из внешней среды.

Все эти штаммы типично росли на МПБ и МПА (колонии R-формы), разжижали желатину, давали рост по уколу, не росли при 45°C , на агаре в мазках из колоний имели вид отдельных палочек, цепочек, нитей, окрашивались по Граму положительно, образовывали споры, давали положительный тест «жемчужного ожерелья» (за исключением одного штамма), не образовывали капсул ни *in vitro*, ни *in vivo*, не обладали гемолитической активностью, протеолитическая активность была присуща лишь 8 штаммам, чувствительны к

75
бактериофага
тельно в реа
РДП. Глико
разнообрази
ни один не
штаммы раз
лозу (3), гал
цит (1), рам
морских сви
у 9 штаммо
Вакцини
ным морфо
отличались
отличия —
питательны
вирулентно
смертельна
ла 10-100 м
свинок в в
лишь псзн
смые вакци
Сущест
чаемых шт
нии морск
штаммами
цина СТИ
рина, «Аф
ставлял от
погенными
мами вооб
ют о нали
капсульни
Анали
метить, ч
ных штам
ритории б
ствам, мо
ми тестам
ке.
Вакци
ными, ави

бактериофагам (за исключением 5 штаммов), реагировали положительно в реакции иммунофлюоресценции, кольцепреципитации и РДП. Гликолитическая активность характеризовалась некоторым разнообразием: все штаммы разлагали сахарозу, глюкозу, мальтозу; ни один не разлагал лактозу, маннит, сорбит, эскулин; отдельные штаммы разлагали фруктозу (19), глицерин (2), рафинозу (2), ксилозу (3), галактозу (1), салицин (2), инозит (3), арабинозу (2), дульцит (1), рамнозу (1). Были полностью авирулентны для кроликов, морских свинок (только у 2-х DCL была равна 10^7), мышей (только у 9 штаммов DCL равна 10^8).

Вакцинные сибиреязвенные штаммы не различались по основным морфологическим и биохимическим свойствам, но существенно отличались от эпизоотических вирулентных штаммов. Основные отличия – отсутствие способности образовывать капсулу как на питательных средах, так и в организме животных, а также низкая вирулентность для белых мышей и морских свинок. Безусловно смертельная доза вакцинных штаммов для белых мышей составляла 10-100 млн спор в зависимости от штамма. Заражение морских свинок в высоких дозах (500 млн и 1 млрд спор) вызывала гибель лишь незначительной части животных. Для кроликов все исследуемые вакцинные штаммы были авирулентны.

Существенные различия были отмечены в иммуногенности изучаемых штаммов. Наиболее высокой иммуногенностью при заражении морских свинок как референс-штаммом, так и вирулентными штаммами обладали бескапсульный штамм № 55-ВНИИВВиМ, вакцина СТИ, вакцинные штаммы «Ихтиман», 34F2, N 3-R – А.Л.Тамарина, «Афганистан». Индекс защищенности для этих штаммов составлял от 40 до 100%. Остальные штаммы оказались слабо иммуногенными, а против заражения некоторыми вирулентными штаммами вообще не создавали иммунитета. Эти данные свидетельствуют о наличии иммунобиологических различий у вакцинных и бескапсульных сибиреязвенных штаммов.

Анализируя результаты проведенных исследований, можно отметить, что основная масса капсульных вирулентных сибиреязвенных штаммов, циркулировавших в последние полстолетия на территории бывшего СССР, в том числе России, типичны по своим свойствам, могут быть уверенно идентифицированы теми лабораторными тестами, которые приняты в ветеринарной лабораторной практике.

Вакцинные сибиреязвенные штаммы должны быть бескапсульными, авирулентными (для кроликов и естественно восприимчивых

животных), иммуногенными с широким защитным спектром, неперсифибельными. По всем остальным параметрам они должны обладать соответствующими характеристиками возбудителя сибирской язвы.

Однако каково происхождение полевых бескапсульных авирулентных штаммов, их роль в эпизоотическом и инфекционном процессах? Мы предполагаем, что они представляют собой продукт эволюции сибиреязвенного микроба, которая осуществляется и в настоящее время. Некоторые исследователи считают, что возбудитель сибирской язвы возник из сапрофитного вида микроорганизмов, вероятно, из *Bac. cereus* (Х.Х.Аббдуллин, 1976). По мнению других, *Bac. cereus* мог сам трансформироваться из *Bac. anthracis* вследствие потери вирулентности. А.С.Коротич и Л.И.Погребняк (1976), ссылаясь на работу Н. Smith и соавторов, пишут, что еще в 1952 г. был поставлен вопрос: «сибиреязвенный штамм, потерявший свою вирулентность, еще *Bac. anthracis* или уже *Bac. cereus*?». Е.И.Еременко и др. (1998) также пишут, что особый интерес представляют штаммы *Bac. anthracis*, потерявшие вирулентность или с редуцированной вирулентностью, эпидемиологические и эпизоотологические особенности которых совершенно не ясны.

Среди изучаемых нами бескапсульных авирулентных штаммов *Bac. cereus* не встречался. Об этом свидетельствуют специфические только для *Bac. anthracis* антигенные (кольцепреципитация, РДП) и другие дифференциальные признаки.

В древние времена, когда появились травоядные животные, их контакты со спорообразующими почвенными сапрофитами становились все чаще и теснее. Проникая в организм животных (через травмы слизистых оболочек), эти микроорганизмы адаптировались к жизнедеятельности во внутренней среде живого организма, приобретая новые качества (патогенность). Возможно, этому способствовало возникновение мутантов с новыми полезными для данных условий свойствами (В.М.Жданов, Д.К.Львов, 1984). В то же время эти микроорганизмы сохраняли благодаря спорообразованию свою жизнеспособность и во внешней среде.

Можно предположить, что на фоне профилактики начался новый этап эволюции возбудителя сибирской язвы. При массовой иммунизации животных этот микроб лишается способности заразить животное, вызвать его гибель и снова попасть во внешнюю среду, чтобы перейти в спорую форму и сохранить свою патогенность до следующей встречи с восприимчивыми животными. Поэтому сибиреязвенный микроб стал утрачивать свое основное свойство, необ-

77
ходимое ему для
посты.

В исследован
в эксперименте
ни в одном слу
же изучали 12
рые были выде
ных штаммов и
вании проб поч
ными сибиреяз
лентные беска
тов, 1978).

Поэтому в
Д.К.Львова (1984)
няется в почве
накопления в
цитаты сомне
ся вирулентн
ных бацилл
нению с усло
утрате вирул
ния в почве.

D. Dragon (1984)
Bac. anthracis
физиологич
на или слож
вание бацил
лишь в почв
ренными ор
начала прор
чувствитель
приводит к
чено, что р
вирулентн
ботки мно
Sterne ста
держании
ние 24 час
Авторы
но предста
прораста
внутри хо

ходимое ему для размножения в животном организме – вирулентность.

В исследованиях M. Ward (1965) мутанты возбудителя антракса в эксперименте были выделены только от иммунных животных и ни в одном случае не выделены от неиммунных животных. Мы также изучали 12 штаммов, лишенных капсулы и вирулентности, которые были выделены от животных. Есть случаи выделения подобных штаммов и из объектов внешней среды, особенно при исследовании проб почвы из старых скотомогильников, где наряду с типичными сибиреязвенными бациллами обнаружены измененные авирулентные бескапсульные штаммы (Г.П. Березкина, 1978; В.С. Федотов, 1978).

Поэтому вряд ли можно согласиться с мнением В.М. Жданова и Д.К. Львова (1984) о том, что «возбудитель сибирской язвы сохраняется в почве неопределенно долго за счет устойчивости спор и их накопления в процессе многократных вегетаций». Первая часть этой цитаты сомнений не вызывает. Именно так, за счет спор, сохраняется вирулентность *Bac. anthracis* в природе. Вегетация сибиреязвенных бацилл в совершенно иных условиях внешней среды (по сравнению с условиями вегетации в живом организме) ведет, вероятно, к утрате вирулентности, которая «не нужна» микробу для размножения в почве.

D. Dragon и R. Rennie (1995) считают, что вегетативные клетки *Bac. anthracis* имеют очень специфические требования в питании и физиологических условиях и плохо выживают за пределами хозяина или сложной искусственной среды. Экспериментальное выращивание бацилл антракса в окружающей среде становится успешным лишь в почве или воде, искусственно обогащенной кровью или внутренними органами животных. Если даже питания достаточно для начала прорастания спор, то вегетативные клетки *Bac. anthracis* очень чувствительны к антагонизму других видов микроорганизмов, что приводит к снижению количества спор антракса. Было также отмечено, что рост *Bac. anthracis* вне хозяина приводит к быстрой потере вирулентности. Это, кстати, является основой для успешной разработки многих вакцин против сибирской язвы. Например, штамм Sterne стал авирулентным после инкубации при 30-процентном содержании CO_2 на питательном агаре с сывороткой лошади в течение 24 часов.

Авторы резюмируют следующим образом: «вне лаборатории трудно представить себе среду, наиболее подходящую для успешного прорастания спор и размножения *Bac. anthracis*, нежели таковая внутри хозяина».

Таким образом, происходит своего рода сапрофитизация циркулирующих сибиреязвенных штаммов. Их вирулентность связывают с капсулой, наличие которой детерминруется плазмидой pX02 (60 МД). Утрата этой плазмиды, что было доказано многочисленными экспериментами, ведет к потере вирулентности (Н.А.Старичин и др., 1994; А.С.Степанов и др., 1989; B.Green et al., 1985; P.Mikesell et al., 1983; J.Uchida et al., 1985). Dong Shulin (1998) различает 4 типа *Bac.anthraxis* (подробно см. в разделе "Этиология"):

- 1) Вирулентный штамм *Bac.anthraxis* (cap⁺, токс⁺), включающий плазмиды pX01 и pX02, патогенный для человека и животных;
- 2) Вакцинный штамм *Bac.anthraxis* (cap⁻, токс⁺), включающий плазмиду pX01 при отсутствии плазмиды pX02;
- 3) Авирулентный штамм *Bac.anthraxis* (cap⁺, токс⁻), включающий плазмиду pX02, но при отсутствии плазмиды pX01. Патогенен для лабораторных животных;
- 4) Непатогенный штамм *Bac.anthraxis* (cap⁻, токс⁻), отсутствуют обе плазмиды, потеряна патогенность.

Есть также данные о связи вирулентности с характером роста на твердых питательных средах. Так, вирулентные капсульные штаммы формируют на сывороточных и бикарбонатных средах слизистые колонии S-формы, авирулентные бескапсульные – R-формы. По нашему мнению, среда выращивания имеет огромное значение. Так, на простом МПА все изученные вирулентные эпизоотические штаммы (292) формировали типичные колонии R-формы («голова Медузы») и RR-формы. Сибиреязвенные полевые бескапсульные штаммы росли в виде колоний RR-формы.

Следовательно, эволюция возбудителя сибирской язвы (антракса) состоит как бы из нескольких фаз – от типичных сапрофитов к типичным паразитам и затем снова к сапрофитам на фоне иммунологического пресса и изменившихся условий внешней среды. Эпизоотическое значение бескапсульных авирулентных сибиреязвенных штаммов пока еще не ясно и требует дополнительного изучения (Л.Н.Юзвик и др., 1983). На все поставленные вопросы ответить пока невозможно. Однако при постановке диагноза необходимо четко дифференцировать их от типично сибиреязвенных и проводить мероприятия в соответствии с истинной причиной возникшей болезни.

Каковы же изменения главных (основных) эпизоотологических критериев (категорий) сибирской язвы (антракса) к настоящему периоду изучения и наблюдения?

1) Восприимчивые животные

Известно, что сибирской язвой болеют крупный рогатый скот, овцы, козы, лошади, олени, верблюды, буйволы, свиньи. Можно констатировать, что спектр поражаемых этой болезнью животных значительно расширился. Этот список дополнили представители многих видов диких животных: слоны, водяные и африканские буйволы, лесные бизоны, белохвостые олени, антилопы – куду, лошадиная антилопа, лесная антилопа (ньяла), голубая антилопа, антилопа-прыгун, хохлатая антилопа (дукер), антилопа импала, антилопа канна, стенбоки, зебры Бурчелла, бегемоты, болотные козлы, страусы, хорьки, ослы.

J.Cooper, I.Matovelo, A.Baskerville (1996) сообщили о заболевании африканских диких гиеновых собак (*Lycan pictus*) в заповеднике Selous Game Reserve в Танзании. В трех сворах у 17% взрослых собак и 33% щенков наблюдали признаки болезни. 4 (17%) из 24 щенков погибли, диагноз подтвердили после вскрытия и патологоанатомического исследования двух погибших щенков. В других сворах болезни не обнаруживали. Подробно картина вскрытия будет представлена в соответствующем разделе книги (глава 4). Окончательный диагноз был поставлен на основании клинических, патологоанатомических и гистологических изменений, а также обнаружения микроорганизмов, сходных с *Bac. anthracis* в мазках крови и лимфе.

Это уже не первое сообщение об обнаружении антракса у африканской дикой собаки. В данной вспышке было зарегистрировано небольшое число пораженных свор, летальность была менее 50% и передача болезни между собаками не установлена. По мнению авторов, маловероятно, чтобы антракс играл большую роль в контроле численности собак.

Однако следует указать на большое эпизоотологическое значение этих фактов. Известно, что собаки и кошки достаточно устойчивы к заражению сибирской язвой – это происходит лишь при попадании в их организм большого числа особей *Bac. anthracis*. Но нет оснований умалять роль этой категории животных в диссеминации возбудителя, так как они поедают сибиреязвенные трупы. Напомним, что в Намибии в крови у 98% львов, гиен, шакалов обнаружены антитела к сибиреязвенному протективному антигену в высоких титрах. Видимо, эти животные сравнительно устойчивы к возбудителю сибирской язвы, но нельзя исключить их участие в распространении болезни, так как часть инфицированных животных не погибает.

N.Krick, V.de Vos (1996) пишут, что 36 видов африканских диких животных погибают от антракса.

2) Источники возбудителя инфекции и факторы его передачи

Прежде всего о терминологии. Несколько устаревшая формулировка: источник возбудителя инфекции – естественная среда обитания патогенного микроба – организм зараженного животного, в котором возбудитель инфекционной болезни не только сохраняется, размножается, но и выделяется из него во внешнюю среду или непосредственно передается другому восприимчивому животному (И.А.Бакулов и соавт., 1986).

Почему это устаревшая формулировка? Дело в том, что в настоящее время признается, что источником возбудителя инфекции может быть и внешняя среда для такой категории болезней, как сапронозы, т.е. болезни, местом развития которых являются органические или неживые вещества внешней среды (например, микозы и др.).

При сибирской язве большая роль в заражении животных принадлежит внешней среде. Если принять точку зрения о том, что споры *Bac.anthraxis* лишь переживают в почве, то правильнее классифицировать ее как фактор передачи, так как размножения и накопления возбудителя в почве, как правило, не происходит, а если и происходит, то сибиреязвенный микроб теряет свою вирулентность (а следовательно, и патогенность для естественно восприимчивых животных). С нашей точки зрения, почву (как и сибиреязвенный труп) правильнее относить к категории факторов передачи возбудителя. Сюда же относятся инфицированные части туш, мясо и мясные продукты, корма, кожу, шерсть, кости, рога.

По мнению V.de Vos (1989), «почва и вода действуют только как транспортное средство для *Bac.anthraxis*». Однако D.Dragon и R.Rennie (1995) считают, что вода способствует концентрированию спор антракса на определенных участках местности и играет важную роль в экологии болезни. Дожди способствуют стоку и скоплению стоячей воды. Споры *Bac.anthraxis* имеют высокую поверхностную гидрофобность и могут перемещаться в потоке воды и скапливаться в стоячих пулах, оставаясь взвешенными в стоячей воде. В сухую погоду происходит испарение этой воды и концентрирование спор.

Конечно, по-прежнему наибольшую опасность представляет больное сибирской язвой животное, выделяющее возбудителя во внешнюю среду. В странах, где преобладает пастбищное содержание животных, огромную опасность представляют места гибели или за-

81
хоронения павших
которые растаски
Как уже был
P.Turnbull (1996)
парке Этоша (Н
Bac.anthraxis от
спор на 1 г почв
высокая концент
ших от антракса
грифов, которые
шакалов обнару
реязвенному ан
Занос сибир
всего происход
ми, а также с ко
Эти случаи от
(D.Joshi et al.,
странах.

Если инф
ми», то бывши
ми дорогами»,
чаи заболеваний
(Техас, Луизи
ведь прошло
По-прежн
как переносчи
(1989) особо
и клещей в ра
R.Rennie, C.C
V.de Vos,
которые пита
пов, затем он
желудочно-к
Крюгера, Ю
Как и в
при контакт
инфицирова
ребления по
мерность со
1996 году из
стран.

хоронения павших от сибирской язвы животных, неубранные трупы, которые растаскивают хищники.

Как уже было указано, по данным P.Lindeque, C.Brain, P.Turnbull (1996), которые провели исследования в Национальном парке Этоша (Намибия), наиболее высокая концентрация спор *Bac.anthraxis* отмечена вокруг трупа в радиусе до 5 метров (до 10^5 спор на 1 г почвы). Они же установили, что в фекалиях гиен также высокая концентрация возбудителя, так как они поедают трупы павших от антракса животных. Ниже концентрация спор в фекалиях грифов, которые питаются на более свежих трупах. У львов, гиен и шакалов обнаружен высокий титр антител к протективному сибиреязвенному антигену.

Занос сибирской язвы (антракса) в благополучные страны чаще всего происходит с инфицированным мясом и мясными продуктами, а также с кормами, в частности с костной (мясокостной) мукой. Эти случаи отмечены в Норвегии (M.Hugh-Jones, 1996), Непале (D.Joshi et al., 1996), Индонезии (S.Hardjoutomo, 1996) и других странах.

Если инфицированные пастбища называют «проклятыми полями», то бывшие скотогонные тракты следует назвать «проклятыми дорогами», так как на этих участках до сих пор возникают случаи заболевания животных антраксом. Об этом сообщили из США (Техас, Луизиана) и Австралии (север Центральной Виктории), а ведь прошло с тех пор не меньше 100 лет.

По-прежнему подчеркивается роль насекомых (членистоногих) как переносчиков возбудителя антракса. P.Bhat, D.Mohan, M.Lalitha (1989) особо подчеркивают значение кровососущих насекомых, мух и клещей в распространении болезни на территории Индии, D.Dragon, R.Rennie, C.Gates (1996) – в Канаде.

V.de Vos, H.Bryden (1996) обращают внимание на мясных мух, которые питаются жидкостью, вытекающей из сибиреязвенных трупов, затем они инфицируют растения, с которыми споры попадают в желудочно-кишечный тракт антилоп куду (Национальный парк Крюгера, Южная Африка).

Как и в прежние времена, люди заражаются сибирской язвой при контактах с больными животными, сибиреязвенными трупами, инфицированным мясом и мясными продуктами, а также при употреблении последних в пищу. В современных условиях эта закономерность сохраняется, о чем сообщили в 1989 году из Турции, а в 1996 году из Индонезии, Танзании, Китая, Южной Кореи и других стран.

Разнообразие форм клинического проявления сибирской язвы у людей – кожная, кишечная, респираторная – указывает на конкретные пути проникновения возбудителя в организм человека. В заражении людей сибирской язвой участвуют и насекомые.

Опасность сибиреязвенных животных весьма велика, в то время как заражение людей от больного сибирской язвой человека не описано ни в одном случае.

В ряде стран обнаружены люди, положительно реагирующие в серологических реакциях с сибиреязвенным протективным антигеном. Этот факт свидетельствует о том, что они контактировали с возбудителем сибирской язвы – были заражены (может быть переболели?) или были вакцинированы.

Так, C.Kleine-Albers, E.Honicke, R.Bohm, R.Pfisterer (1989) сообщили из Германии, что сыворотки 13 лиц, ретроспективно диагностированных как заболевшие антраксом во время эпидемии в Швейцарии, исследовали на IgG антитела против протективного антигена методом энзим-иммуноанализа (EIA). Результаты соотносились с данными исследований с помощью антраксина.

В Северной Африке P.Hunter, M.Van Schalbroyk, J.Couks (1989) выявляли у людей антитела к протективному антракс антигену. Авторы исследовали воздействие штамма Sterne в процессе лабораторной и производственной деятельности у персонала Ветеринарного НИИ в Южной Африке и Намибии. С помощью теста ELISA установили, что антитела появляются при случайных контактах со штаммом Sterne преимущественно при вдыхании.

По данным R.Pfisterer (1989), в Швейцарии использование русского аллергена «Anthraxin», предложенного Э.Н. Шляховым и др. в 1957 году, показало, что этот препарат является высокоспецифичным и чувствительным для выявления больных, постановки ретроспективного диагноза и может быть использован для определения поствакцинального иммунитета.

3) Стационарность сибирской язвы (антракса)

Это наиболее яркая эпизоотологическая особенность сибирской язвы. Сегодняшние наблюдения показывают, что она сохранилась – в ранее неблагополучных пунктах спустя многие десятилетия полного благополучия вновь возникали случаи сибирской язвы. Как правило, это было связано со стихийными бедствиями (наводнениями, землетрясениями, оползнями, пыльными бурями и т.п.), а также с проведением различного рода земляных, строительных и мелиоративных работ. Вспышки антракса в Австралии и США (Техас, Луизиана) произошли на трассах перегона скота, причем с момента

83
первых вспышек про-
рованные пастбища
антраксом («прокля-
Блестящим под-
служит проведенные
логического оруж-
эффективность исп-
та биологической в-
ния, спустя многие
ры Bac.anthraxis.
ке Крюгера Bac.a
200 лет.

4) Периодичность сибирской язвы

То, что сибир-
гополучных пунк-
ли эта повторяе-
установлено.

Понятие «п-
лируется таким
– повторяемост-
местности чере-
ности иммунит-
ных и другим
нительно к си-
особой закон-
вается. Прим-
лет.

Наприме
сибирская яз-
крупными э-
тае, по данн-
лет. В Инди-
ду эпизоот-
кие-то опр-
представл-
Другой
вольно чет-
ное полущ-
вий. Как
года. Инц

первых вспышек прошло не менее 100 лет (1890 г.). Ранее инфицированные пастбища многие годы сохраняют опасность заражения антраксом («проклятые поля»).

Блестящим подтверждением стационарности сибирской язвы служит проведенный англичанами эксперимент по испытанию биологического оружия на острове Gruinard. Им удалось доказать эффективность использования возбудителя антракса в качестве агента биологической войны, а на территориях, где проводились испытания, спустя многие десятки лет обнаруживали жизнеспособные споры *Bac.anthraxis*. По данным V.de Vos (1990), в Национальном парке Крюгера *Bac.anthraxis* была выделена из костей возрастом около 200 лет.

4) Периодичность (повторяемость) вспышек сибирской язвы (антракса). Сезонность болезни

То, что сибирская язва может повторно возникать в ранее неблагополучных пунктах, ни у кого сомнений не вызывает. Подчинена ли эта повторяемость каким-либо закономерностям? Пока еще не установлено.

Понятие «периодичность эпизоотий» в настоящее время формулируется таким образом: «периодичность эпизоотий (гр. *periodikos*) – повторяемость (повторное возникновение) эпизоотий в какой-либо местности через несколько лет, связанная с изменением напряженности иммунитета, увеличением поголовья восприимчивых животных и другими факторами» (И.А.Бакулов и соавт., 1986). Применительно к сибирской язве надо искать причины в чем-то ином, пока особой закономерности в проявлении сибирской язвы не просматривается. Примером могут служить некоторые сведения последних лет.

Например, в Южной Африке в Национальном парке Крюгера сибирская язва характеризуется периодичностью, интервалы между крупными эпизоотиями – 10 лет (V.de Vos, H.Bryden, 1996). В Китае, по данным Liang Xudong (1998), эти интервалы составляют 4-5 лет. В Индии, судя по представленным диаграммам, интервалы между эпизоотиями были 3-5 лет (M.Lalitha et al., 1996). Сделать какие-то определенные выводы из этих скудных сведений пока не представляется возможным, требуются дальнейшие наблюдения.

Другой вид периодичности – сезонность просматривается довольно четко, но зависит от географии болезни (Южное или Северное полушария), от климатических, а иногда и хозяйственных условий. Как правило, вспышки регистрируются чаще в теплое время года. Инцидентность повышается в условиях засухи.

В Европе — преимущественно летом, пик заболеваемости в августе, хотя в Турции — поздним летом и осенью. В России — летом, а в Швеции — зимой, но за счет привозных инфицированных возбудителем сибирской язвы кормов.

В США и Канаде — июнь-август, в Мексике — два пика: март и июнь. В Канаде инцидентность возрастает, если сухому лету предшествовала влажная весна.

В Южной Америке четкой сезонности антракса не просматривается.

В Африке в различных зонах по-разному. Интерес представляют наблюдения в Намибии в Национальном парке Этоша: для копытных сезонность в марте, в конце сезона дождей, с пиком заболеваемости в апреле, а для слонов — конец сухого сезона.

В Южной Африке — в сухой сезон в конце зимы и начале лета.

В Китае — в теплое время года.

В Индии — с июля по октябрь.

В Австралии максимум падает на зимние месяцы (самые теплые для Южного полушария).

5) Характеристика эпизоотического процесса сибирской язвы (антракса) в современных условиях

Как уже было показано, сибирская язва (антракс) в большинстве стран в прошлом характеризовалась проявлением в виде эпизоотий, крупных вспышек с поражением многих десятков и сотен животных в одном очаге, с высокими показателями летальности. В современных условиях благодаря налаженному контролю за этой инфекцией, системе профилактических мероприятий с применением высокоэффективных средств специфической профилактики в странах, где хорошо налажена работа ветеринарной службы, эпизоотический процесс характеризуется лишь проявлением спорадических, единичных случаев.

Причем оперативность ветеринарных служб в цивилизованных странах достаточно высока, позволяет быстро поставить диагноз и провести эффективные противоэпизоотические мероприятия, что в свою очередь обеспечивает локализацию вспышки, недопущение распространения болезни, ограничение числа больных животных и предупреждение заболевания людей.

Однако энзоотичность сибирской язвы заставляет держать ситуацию под постоянным контролем, особенно на ранее неблагополучных территориях. В ряде случаев благополучие достигается широкимасштабными вакцинациями животных. И при этом «цель оправдывает средства».

85
СИБИРСКАЯ
В то же время
язвой (антраксом)
сегодня наблюда
являются у свобо
пада и др.).

3.1. Клас

По современ
человека и жи
Schizomycetes
1917; семейству
1872; типовому

За многол
ленными иссл
институтах и л
микроорганиз
обладающим
определять ег

Однако на
ти Bac.anthrac
которым свой

Для этой
современной
исследование
ственных аз
Bac.mycoides
зации и содер
сделано закл
могеным вид
гии представи
меньше

В то же время, как показывает обзор заболеваемости сибирской язвой (антраксом), на Земном шаре еще сохранились регионы, где и сегодня наблюдаются эпизоотии болезни. Особенно часто они появляются у свободно живущих диких животных (Африка, Азия, Канада и др.).

3. BAC. ANTHRACIS – ВОЗБУДИТЕЛЬ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЖИВОТНЫХ И ЛЮДЕЙ

3.1. Классификация и таксономия

По современным представлениям возбудитель сибирской язвы человека и животных принадлежит (по Берджи, 1986) к классу II Schizomycetes N.Naegeli, 1857; порядку IV Eubacteriales Buchanan, 1917; семейству XIII Bacillaceae Fischer, 1895; роду I Bacillus Cohn, 1872; типовому виду *Bacillus anthracis* Cohn, 1872.

За многолетнее изучение *Bac.anthraxis*, проведенное многочисленными исследователями в различных научно-исследовательских институтах и лабораториях, сложилось четкое представление об этом микроорганизме, как самостоятельном представителе микромира, обладающим целым рядом присущих ему свойств, позволяющих определять его среди огромного многообразия микроорганизмов.

Однако наука продолжает искать подтверждения уникальности *Bac.anthraxis* и его отличительных признаков от близких по некоторым свойствам микроорганизмов.

Для этой цели привлекаются новейшие методы, применяемые в современной таксономии. Так, R.Bohm и G.Spath (1990) провели исследование 10 штаммов *Bac.anthraxis* и 19 штаммов других родственных аэробных спорообразующих бацилл (*Bac.cereus*, *Bac.mycoides*, *Bac.thuringiensis*) посредством ДНК-ДНК гибридизации и содержания G+C. В результате проделанной работы было сделано заключение, что *Bac.anthraxis* является «отчетливым и гомогенным видом с гомологиями между штаммами 90-99%. Гомологии представителей других видов к *Bac.anthraxis* были равны или меньше 59%».

В работе D.Stroman et al. (1998) описаны исследования штаммов *Bacillus* на предмет определения пригодности автоматического рРНК оперон риботипирования для выявления различий штаммов этого рода. Для этого использовали систему Qualicon ТМ, позволяющую автоматизировать многие ступени риботипирования, включая расщепление хромосомальной ДНК разными рестриктазами, электрофорез переваренной хромосомальной ДНК, перенос фрагментов ДНК к мембранам гибридизации, гибридизацию, хемилюминисцентное обнаружение фрагментов хромосомальной ДНК и компьютерный анализ.

У *Bac.anthraxis* обнаружены уникальные фрагменты рестрикции по сравнению с другими тремя видами *Bacillus*.

В своем обзоре J.Ezzel et al. (1998), посвященном идентификации *Bac.anthraxis*, указывают на то, что анализы проб окружающей среды, которые часто содержат близкородственные виды, показывают наличие микроорганизмов несибиреязвенной природы, но обладающих частично геномными и фенотипическими сходными признаками. Автор считает, что новые технологии должны использоваться осторожно и только в сравнении с классическими методами «Gold standart» до тех пор, пока они будут оценены по критериям их специфичности и чувствительности.

Оценка различных методов показала, что использование g-фазовой чувствительности, обнаружение галактозо /N-ацетилглюкозамин полисахарида и поли-Д-глутаминовой кислоты, обнаружение последовательностей генов токсина и капсулы с помощью ПЦР являются наиболее надежными индикаторами.

Наименее надежны профили биохимического теста, которые основываются на утилизации субстрата.

Вышеуказанные авторы представляют метод идентификации *Bac.anthraxis*, основанный на предварительных тестах (менее 1 часа), затем последующих методах для подтверждения, которые длятся от 2 до 24 часов.

P.Turnbull (1998) в своей статье с многообещающим названием «Окончательная идентификация *Bac.anthraxis*» пишет, что на ранних стадиях истории бактериологии определение *Bac.anthraxis* представлялось простым, так как его было легко выделить и идентифицировать в случае классической сибирской язвы. Однако, как указывает автор, названия, относящиеся к 40-м годам, такие как *Bac.anthraxis*, *Bac.anthraxis similis* и *Bac.pseudoanthracis*, показывают, что у наших предшественников были проблемы с идентификацией, так как изоляты, сходные с *Bac.anthraxis in vitro*, не вызывали

87 СИБИРСКАЯ ЯЗВА (АНТРАКС)
сибирскую язву у лабораторных животных. Эти изоляты относились к *Bac.thuringiensis* и *Bac.pastoris*. Близкое родство для видов *Bacillus* (Smiley) было подтверждено из ДНК-ДНК гибридизации. Было установлено, что *Bacillus* 16S рРНК последовательностями 23S рРНК последовательностями к этим физическим хромосомам показали частичную идентичность к одному виду.

3.2. Морфология

По данным A.Foue... бескапсульных клеток содержится от 5 до 10 бактерий является, по мнению многих исследователей, роль этого слоя во внешнем слое, очевидно, выполняет формы клетки, молекулы сацин фагов. Этот слой является патогенных бактерий в связи бактерий с токсигенностью соединяться с компонентами и Sap. Соответствующие были клонированы последовательности белковых признаков находим продолжительности твердили, что возбудители, названные гены, кодирующие белки обнаруживаются на поверхности. EA1

сибирскую язву у лабораторных животных. По всей вероятности, эти изоляты относились к *Bac.cereus*.

Близкое родство между *Bac.anthraxis*, *Bac.cereus*, *Bac.thuringiensis* и *Bac.mycoides* было полностью распознано, когда была составлена первая эффективная система классификации для видов *Bacillus* (Smith et al., 1952). Позднее это близкое родство было подтверждено изучением ДНК, более совершенных методов ДНК-ДНК гибридизации в 1970-1980 гг., в 1991-1992 гг. Ash et al. было установлено, что *Bac.anthraxis* и *Bac.cereus* обладают идентичными 16S рРНК последовательностями и только двумя отличиями в их 23S рРНК последовательностях.

В дополнение к этому Carlson et al. (1994) установили, что физические хромосомальные карты *Bac.cereus*, *Bac.thuringiensis* показали частичную идентичность, соответствующую принадлежности к одному виду.

3.2. Морфология

По данным A.Fouet et al. (1998), клеточная стенка вегетативных бескапсульных клеток *Bac.anthraxis* окружена S-слоем, в котором содержится от 5 до 10% всего клеточного белка. Его синтез для бактерий является, по-видимому, энергопотребляющим. S-слой имеют многочисленные виды бактерий, это свидетельствует о важной роли этого слоя во взаимоотношениях между клеткой и средой. S-слой, очевидно, выполняет различные функции, включая сохранение формы клетки, молекулярную фильтрацию. Он служит местом фиксации фагов. Этот слой является фактором вирулентности, защищает патогенных бактерий от инактивации комплементом, способствует связи бактерий с молекулами хозяина и повышает их способность соединяться с макрофагами.

Компонентами S-слоя являются два поверхностных белка EA1 и Sap. Соответствующие им гены представлены на хромосоме. Они были клонированы и секвенированы авторами. Аминокислотные последовательности EA1 и Sap свидетельствуют о классических белковых признаках S-слоя. В работе S.Mesnager et al. (1998) мы находим продолжение исследований S-слоя *Bac.anthraxis*. Они подтвердили, что возбудитель сибирской язвы синтезирует два белка S-слоя, названных Sap и EA1. Были клонированы и секвенированы гены, кодирующие эти белки. Авторы изучили способность этих белков обнаруживать гетерологичные полипептиды на клеточной поверхности. EA1 и Sap, несомненно, синтезируются *in vivo*.

Продолжаются исследования, посвященные капсуле *Bac.anthraxis*. Известно, что капсулу у этого микроорганизма составляет поли-Д-глутаминовая кислота, которая является одним из основных факторов вирулентности возбудителя сибирской язвы. В своем обзоре J.Ezzell (1998) указывает, что капсула преодолевает защиту хозяина через ингибирование фагоцитоза макрофагами вегетативных клеток. Вместе с летальным и отечным факторами, чьи клетки-мишени включают макрофаги и нейтрофилы, капсула дает возможность вирулентным бациллам беспрепятственно размножаться в инфицированном организме хозяина.

Капсула является наружной по отношению к S-слою вегетативной клетки. Три мембраносвязанные энзима, необходимые для синтеза капсулы, кодируются рХ02 плазмидой, массой 60 мегадальтон. Цистроны классифицируются в таком порядке – *Cap*, *Cap C*, *Cap A* и кодируют белки 44, 16 и 46 килодальтон соответственно.

Синтез капсулы и токсина происходит частично под бикарбонатной регуляцией с помощью взаимодействия регулирующих белков. Синтез токсина кодируется рХ01 плазмидой, массой 100-мегадальтон.

Дополнительный белок (с предсказанными размерами 51 килодальтон) кодируется *der* геном, расположенным внизу *cap* региона. и, по-видимому, является депломеразой, которая катализирует гидролиз поли-Д-глутаминовой кислоты внутри полиглутаматов низкомолекулярного веса. Несмотря на то, что биологические функции *der* белка не известны, предполагается, что полиглутаматы низкомолекулярного веса, образованные под действием энзима, могут влиять на ингибирование механизмов защиты хозяина.

Сибиреязвенная бацилла при неблагоприятных условиях существования способна формировать споры. В каждой вегетативной клетке, или спорангии – так она в этот момент называется – образуется только одна спора, чаще располагающаяся центрально, реже – субтерминально. Ее ширина 0,8-1 мкм, и она никогда не превышает ширину бациллы, длина споры – 1,2-1,5 мкм (И.И.Белоконов, 1970; Т.А.Тржецкая и А.В. Куликовский, 1972; А.Л.Авакян, Л.Н.Кац и И.Б.Павлова, 1972).

Биологическая роль спор прежде всего заключается в том, что они являются формой защиты спорообразующих бактерий от вредных воздействий окружающей среды и, таким образом, выполняют функцию сохранения вида. Споры способны долго сохранять генетический материал исходных клеток и обеспечивать передачу основных свойств потомству в последующих генерациях (С.Г.Колесов, 1986).

СИБИРСКАЯ
Споры образ
теля сибирской я
(Н.А.Михин, Н.
I.Bekker, 1938).
язвенных штам
мутанты, котор
тур (J.Takahash
ходных штаммо
средах (J.Noch
на плотных пит
лено (Р.Р.Азиз
ка, а также в н
образуют.

Для спорос
таточный досту
дефицит питате
влажность (D.
ция среды (К.
нер, К.М.Синя

Сибиреязв
дах, бедных бе
содержащих
(В.В.Еременко
а также други
мин, глицери
отмечает, что
ток выше, чем

Возбудите
выше 42°C и
и S.Rittenberg

Образова
которое обра
К.Ф.Робина
варьируется,
делах, но ча
ставляющее
торами нукл
Составное я
клеточной ст
новременно
Ca⁺⁺

Споры образуют подавляющее большинство штаммов возбудителя сибирской язвы, однако встречаются и аспорогенные варианты (Н.А. Михин, Н.И. Леонов, 1938; А.С. Коротич, Л.И. Погребняк, 1976; I. Bekker, 1938). Популяции некоторых спорообразующих сибиреязвенных штаммов содержат спонтанно возникшие аспорогенные мутанты, которые можно выделить с помощью одноклеточных культур (J. Takahashi, 1938). Аспорогенные мутанты отличаются от исходных штаммов по морфологии колоний на плотных питательных средах (J. Hoch и J. Mathews, 1973). Спорообразование в жидких и на плотных питательных средах у S-форм бактерий весьма замедлено (Р.Р. Азизбеян и др., 1976). В организме животных и человека, а также в нескрытых трупах бациллы сибирской язвы спор не образуют.

Для спорообразования сибиреязвенных бацилл необходим достаточный доступ кислорода, температура 26-30°C (D. Davies, 1960), дефицит питательных веществ (N. Grelet, 1952, 1957), определенная влажность (D. Davies, 1960), нейтральная или слабощелочная реакция среды (К.М. Синяк, О.М. Вернер, 1983; В.П. Волкова, О.М. Вернер, К.М. Синяк, 1988).

Сибиреязвенные бациллы образуют споры в питательных средах, бедных белковым азотом (В.И. Егоров, Н.А. Спицин, 1961) и не содержащих глюкозы — репрессора синтеза многих ферментов (В.В. Еременко, А.Л. Николаев, 1973; I. Lopez, B. Wong, E. Freese, 1979), а также других субстратов гликолиза, таких как фруктоза, глюкозамин, глицерин, L-малат или манноза (F. Freese, 1972). R. Hattori отмечает, что скорость спорообразования у адсорбированных клеток выше, чем у свободных.

Возбудитель сибирской язвы не образует споры при температуре выше 42°C и ниже 12°C, а также в условиях анаэробноза (M. Puziss и S. Rittenberg, 1957).

Образование споры начинается с формирования составного ядра, которое образуется из первичных ядер цитоплазмы (G. Knaysi, 1957, К.Ф. Робинау, 1960). Число первичных ядер в составном ядре варьируется, в зависимости от окружающих условий, в широких пределах, но чаще их насчитывают от 2 до 6. Основное вещество, составляющее первичные ядра и называемое вышеупомянутыми авторами нуклеоплазмой, состоит из комплекса РНК и метафосфата. Составное ядро превращается в проспору. По мере образования клеточной стенки (оболочки) проспора превращается в спору. Одновременно с образованием оболочки спор происходит поглощение Ca^{++} , затем следует синтез дипиколиновой кислоты (ДПК). При не-

достатке Ca^{++} количество ДПК в спорах уменьшается. Такие споры слабо преломляют свет и неустойчивы при хранении. Внесение в Ca^{++} -дефицитную среду на ранних стадиях спорообразования двухвалентных ионов Ca приводит к образованию нормальных светопреломляющих устойчивых при хранении спор.

ДПК найдена как у аэробных, так и у анаэробных спор (J. Powell, R. Strang, 1956). Она составляет 6-12% от сухой массы спор и полностью отсутствует в вегетативных клетках.

Вышеупомянутые авторы показали, что ДПК образует тесную связь с Ca^{++} и белком как комплекс ДПК – Ca^{++} -белок. От него зависит степень устойчивости бактериальных спор.

I. Lewis (1960) установил, что комплекс ДПК – Ca^{++} -белок обуславливает сжатие клеточной стенки споры, поддерживая ее в безводном состоянии. Это придает споре высокую степень устойчивости к неблагоприятным воздействиям.

П.Н.Бургасов и Г.И.Рожков (1984) разделяют спорогенез на 4 основные стадии: подготовительную, образование протоспор, образование готовых спор, образование зрелых спор. Морфологически эти стадии выглядят следующим образом.

Подготовительная стадия характеризуется появлением в бациллах слабо заметной зернистости как результат концентрации в них цитоплазмы. Объем клеток несколько уменьшается. В многоклеточных нитях заметны признаки дифференциации бацилл.

Стадия образования проспор начинается с появления в центре бацилл мелких светопреломляющих точек, которые, постепенно увеличиваясь, принимают округлую форму. Культура сохраняет многоклеточные нити.

Стадия образования готовых спор характеризуется распадом многоклеточных нитей на более короткие с одновременным распадом спорангий (вегетативных клеток, в которых находятся споры). В результате этого происходит освобождение спор от вегетативных клеток, в которых они образовались.

В стадии образования зрелых спор происходит уплотнение клеточных стенок и цитоплазмы спор. Остатки спорангия полностью распадаются и лизируются. Клеточные стенки спор становятся тоньше, тельца спор уменьшаются в объеме. Все или почти все споры становятся разобщенными, отличаются хорошей светопреломляемостью. Клетки с незавершенным спорогенезом теряют правильную цилиндрическую форму, укорачиваются, относительно быстро отмирают и подвергаются лизису.

91

Продолжитель-
тельной среды, усл-
териала варьирует
спор с агаризован-
бульонных культу-
Потребность в
венных бацилл в
размножения клет-
туры не нуждаются
проспор готовых
ких условиях за-
жидкой питател-
Споры гораз-
внешней среде с
различным возд-
ной оболочки, ни-
евой соли ДПК.
ка содержит 76
спора - только
Степень жи-
ти спор зависят
ти входящих в
ния.

Споры, обр-
ры, сформиро-
цинного штам-
обладают бол-
аналогичными
дах. Скорее
последних (пр-
нию со спора-
По данн-
цинного штам-
30 процентно
температуре
ток в течени-
Многие
лабораторны-
могут сохран-
вирулентным
ков, И. А. Ба

Продолжительность спорогенеза в зависимости от состава питательной среды, условий культивирования и качества посевного материала варьируется в значительных пределах. Величина зрелых спор с агаризованной среды составляет в среднем $1,5 \times 1$ мкм, а из бульонных культур при аэрировании — $1,2 \times 0,7$ мкм.

Потребность в кислороде на фазе спорообразования сибиреязвенных бацилл в 5-10 раз ниже, чем на фазе наиболее интенсивного размножения клеток. После того как образовались споры, культуры не нуждаются в специальном их аэрировании. Образование из спор готовых и зрелых спор может осуществляться в статических условиях за счет использования кислорода, растворенного в жидкой питательной среде.

Споры гораздо устойчивее, чем вегетативные формы бацилл, и во внешней среде сохраняются дольше. Высокая устойчивость спор к различным воздействиям связана с наличием плотной многослойной оболочки, низким содержанием в ней воды и присутствием кальциевой соли ДПК. По данным Р. Gerhardt (1967), вегетативная клетка содержит 76,6% воды, прорастающая спора — 73%, а покоящаяся спора — только 64,8%.

Степень жизнеспособности и продолжительность сохраняемости спор зависят от состава питательной среды и сбалансированности входящих в нее компонентов, условий культивирования и хранения.

Споры, образовавшиеся при $18-20^\circ\text{C}$, более резистентны, чем споры, сформировавшиеся при $35-38^\circ\text{C}$ (М. В. Рево, 1931). Споры вакцинного штамма СТИ, полученные с плотных питательных сред, обладают большей устойчивостью при хранении по сравнению с аналогичными спорами, полученными в жидких питательных средах. Скорее всего, это объясняется более низким содержанием в последних (примерно на 30-40%) дипиколината кальция по сравнению со спорами с агаризованных сред.

По данным П. И. Бургасова и Г. И. Рожкова (1984), споры вакцинного штамма СТИ, выращенные на плотной среде, сохранялись в 30 процентном растворе глицерина и дистиллированной воде при температуре $0-4^\circ\text{C}$ без снижения жизнеспособности всей массы клеток в течение 30 лет (срок наблюдения).

Многие авторы утверждают, что сибиреязвенные споры как в лабораторных, так и в естественных условиях, например, в почве, могут сохраняться в течение 30-60 и более лет жизнеспособными и вирулентными (Н. А. Михин, 1942; Г. Я. Чуйская, 1971; Р. А. Салтыков, И. А. Бакулов, В. А. Гаврилов, 1976 и др.).

П.А.Ивашкевичем и др. (1959) установлено, что биологически полноценные споры при выращивании их методом микрокультур прорастают почти в 100% случаев в течение 2,5 часа. Не прорастают лишь нежизнеспособные споры, которых в большинстве популяций бывает не менее 5-10%. П.Н.Бургасов и Г.И.Рожков (1984) также получили данные, свидетельствующие о том, что удлинение срока прорастания спор свыше 2,5 часа является прогностическим признаком наступающей их гибели. В их экспериментах в течение 2,5 часа прорастали и свежие, не хранившиеся суспензии спор, и длительно хранившиеся (15-20 лет) споровые культуры.

Причиной гибели спор, по мнению некоторых ученых, является переход их в предвегетативное состояние. Это явление сопровождается набуханием клеточных стенок и цитоплазмы, активацией энзиматических процессов и выходом из клеток дипиколината кальция (Н.Нalworson, 1959).

Фазы споропрорастания как в жидкой, так и на плотной питательных средах проходят практически в одинаковые сроки. В процессе прорастания визуально различают набухание споры, выход протопласта из споры и перерастание (удлинение) его в вегетативную клетку. Особенно наглядно это выражено при использовании метода микрокультур (П.А.Ивашкевич и др., 1959; Б.Я.Михайлов и др., 1960).

Как показали исследования D.Davies (1960), наиболее благоприятной для прорастания спор является температура 39°C (споры прорастали за 2 часа). При температуре выше 39°C и ниже 30°C сроки прорастания спор значительно удлинялись.

Бактериальные споры быстро реагируют на механизмы, побуждающие их к прорастанию. По данным ряда авторов, тепловое воздействие при 66-70°C в течение 30 минут стимулирует прорастание спор. Этот процесс известен в литературе как тепловая активация покоящихся спор (N.Roth, D.Lively, H.Hodge, 1954; A.Fernelius, 1960). Показано также стимулирующее влияние на прорастание спор некоторых аминокислот, в частности L-аланина и L-тирозина. Добавление этих аминокислот приводило к значительному ускорению споропрорастания (М.В.Земсков, М.И.Соколов, В.М.Земсков, 1972).

L.Rode, J.Foster (1963) (цит. по П.Н.Бургасову и Г.И.Рожкову, 1984) считают, что в основе механизма прорастания спор лежит высвобождение из них протеиназ и дипиколиновой кислоты. Первой ступенью споропрорастания является нарушение клеточных стенок покоящихся спор и присущей им водонепроницаемости. Второй ступенью — проникновение воды, которая приводит к ра-

93
СИБИРСКАЯ ЯЗВА
створению «защитной»
ции энзиматических
растанию. В резуль
рыв клеточных стенок
ка протопласта. По
течение 1-1,5 часа
(Н.Nalworson, 1959)
Образовавшаяся
через 18-20 минут
теринскую, снова
ние вплоть до обр
вегетация и разм
ствляется только
ния споры. В ре
клеточные нити в
щие из материнск
теринской субста
бациллярных нит
лять от себя до
двухполюсном

П.Н.Бургасов
существования
способе размно

Идет в науку
ных спор с ор
Bac.anthraxis
Bac.thuringien
(S.Charlton et al.)
полненный шар
экзоспора мож
робный химич
основном бел
тов.

Чтобы уст
в инфекционн
белков. В пр
Bac.sereus д
провести ср
Bac.anthraxis
сти для ряда
вод о том, чт

створению «защитных» солей дипиколиновой кислоты и к активации энзиматических реакций, побуждающих споры к жизни и прорастанию. В результате резкого набухания спор происходит разрыв клеточных стенок в одной точке споры, откуда появляется почка протопласта. Последняя, постепенно удлиняясь, вытягивается в течение 1-1,5 часа в вегетативную клетку до обычных ее размеров (Н. Halworson, 1959).

Образовавшаяся первичная материнская клетка отделяет от себя через 18-20 минут дочернюю особь. Последняя, превращаясь в материнскую, снова отделяет от себя дочернюю; и так идет размножение вплоть до образования бактериальной цепочки. Таким образом, вегетация и размножение клеток в бактериальной цепочке осуществляется только в однополюсном направлении от точки прорастания споры. В результате такого размножения образуются многоклеточные нити возбудителя сибирской язвы, почти сплошь состоящие из материнских клеток, объединенных между собой общей материнской субстанцией. Однако при дроблении или разрыве таких бациллярных нитей материнская клетка может вегетировать и отделять от себя дочерние клетки в той же последовательности, но в двухполюсном направлении.

П.Н.Бургасов и Г.И.Рожков (1984) исключают возможность существования фазы логарифмического роста клеток при таком способе размножения.

Идет в науке и поиск механизмов взаимодействия сибиреязвенных спор с организмом восприимчивого хозяина. Изучение спор *Bac.anthraxis* и близко родственных видов *Bac.cereus* и *Bac.thuringiensis* показало, что эти виды обладают экзоспорием (S.Charlton et al., 1998), который представляет собой неплотно заполненный шар, подобный слою, окружающему спору. Считают, что экзоспора может играть роль в адгезии и патогенности споры. Подробный химический анализ показал, что экзоспорий составляют в основном белки с дополнением липидов и карбогидратных элементов.

Чтобы установить, может ли экзоспора *Bac.anthraxis* играть роль в инфекционном процессе, авторы характеризовали компоненты его белков. В предварительных опытах использовали непатогенный *Bac.cereus* для разработки технологии, чтобы иметь возможность провести сравнение в последующих опытах с включением *Bac.anthraxis*. Были определены аминокислотные последовательности для ряда белков, присутствующих в экзоспории. Делается вывод о том, что функциональные белки экзоспоры *Bac.anthraxis* мо-

гут участвовать в обмене и в других взаимодействиях споры с клеткой хозяина.

Однако N. McKinney et al. считают, что споры бацилл составлены из генетически уникальных белковых структур. Аналогичные структурные белки существуют только в эндоспоре, формирующей бактерию. Генетическая экспрессия структурных белков споры сохраняется до спорулирующего состояния клетки – подобные белки не обнаружены в вегетативных клетках бацилл.

C. Quinn, P. Turnbull, T. Melling (1990) для изучения высокомолекулярных белков, расположенных на поверхности зарождающихся спор *Bac. anthracis*, исследовали специфичность этих белков для *Bac. anthracis* в сравнении с экстрактами спор *Bac. cereus*. Оказалось, что выделенные белки не обладали никакой протективной эффективностью.

Изучением белков споровой оболочки *Bac. anthracis* занимались также S. Watson, R. Manchee (1990). Они выращивали штамм Ames *Bac. anthracis* на пяти разных питательных средах и определяли различия, вызванные выращиванием на этих средах. Одновременно они искали белки, специфичные для *Bac. anthracis*.

3.3. Изучение сибиреязвенного (антракс) токсина

В отечественной литературе был опубликован ряд работ, посвященных изучению сибиреязвенного токсина. В книге Ю. В. Езепчука «Биомолекулярные основы патогенности бактерий» (1977) дается описание молекулярной структуры, антигенных свойств и биологического действия экзотоксина *Bac. anthracis*. Характеристика биологической активности компонентов токсина и систем, состоящих из них, представлена в табл. 21.

В материалах семинара, состоявшегося в 1990 году, опубликована работа Ю. В. Езепчука и А. Р. Битцаева «Структурное сходство токсинов *Bac. cereus* и *Bac. anthracis*». Авторы считают, что существует структурное и функциональное сходство между диареягенным – летальным токсином (DLT) *Bac. cereus* и экзотоксином *Bac. anthracis*.

DLT обладает тремя типами биологической активности: диареягенным, летальным и васкулярным, увеличивающим проницаемость. Используя ионообменную хроматографию вместе с гельфильтрацией, разделили белки DLT. Отдельные компоненты были обозначены А, В, С. Молекулярные массы компонентов были А – 37 кДа, В – 42 кДа, С – 36 кДа. Взяты отдельно, ни один из трех компонентов не проявлял какого-либо из видов активности, специфичных

Компонент токсина	
Фактор I (хелатин)	
Фактор II (белок)	
Фактор III (белок)	
I + II	
I + III	
II + III	
I + II + III	

Примечание: в таблице описывается EF-антиген; данные мы бы

для целого токсина, для жидкой комбинации с другими реакциями микробов.

Обстоятельства, при которых токсин Ва... используется в эксперименте), чтобы... на за последние материалы Меж... рефераты

Впервые о сибирской язвенной инфекции... стерильная сырая... 60-х годов были... эффектов с протективной... III) и отечного кД соответствующие

Таблица 21.

Характеристика биологической активности компонентов сибиреязвенного токсина (H.Smith, H.B.Stoner, 1967)

Компонент токсина	Токсичность		Иммуногенность для морских свинок
	Образование отека	Летальность для мышей	
Фактор I (хелатирующий агент)	-	-	-
Фактор II (белок)	-	-	++
Фактор III (белок)	-	-	-
I + II	++++	+	+++
I + III	-	-	+
II + III	-	++	+++
I + II + III	++	+++	++

Примечание: Фактор I в современной англоязычной литературе обозначается EF-отечный фактор; фактор II обозначается PA-протективный антиген; фактор III обозначается LF-летальный фактор. Эти обозначения мы будем использовать при дальнейшем изложении текста.

для целого токсина. Однако А в комбинации с В вызывал аккумуляцию жидкости в соответствующих моделях, в то время как С в комбинации с В убивал мышей. Никаких антигенных перекрестных реакций между *Bac.cereus* и *Bac.anthraxis* не было обнаружено.

Обстоятельно и подробно дано описание молекулярной природы токсина *Bac.anthraxis* в обзоре А.С.Степанова (1991). Мы воспользуемся этим богатым материалом (дается в некотором сокращении), чтобы затем показать, что нового сделано в изучении токсина за последнее десятилетие и, в частности, опубликовано в тех материалах Международных симпозиумов по сибирской язве, которые нами реферируются.

Впервые о продукции токсигенного комплекса возбудителем сибирской язвы сообщили в 1955 г. H.Smith et al., показавшие, что стерильная сыворотка крови морских свинок, погибших от сибиреязвенной инфекции, вызывает при ее введении интактным животным отек подкожной клетчатки и быструю их гибель. Работами 60-х годов была установлена непосредственная связь указанных эффектов с продукцией экзотоксина, выделение и частичная очистка которого показали, что он состоит из трех отдельных белков — протективного антигена (РА, фактор II), летального (LF, фактор III) и отечного (EF, фактор I) — факторов мол. массой 85, 83 и 89 кД соответственно. Было выяснено, что ни один из отдельно взятых

белков не вызывал токсического эффекта, тогда как введение крысам линии Фишер 344 сочетаний РА + LF (летального токсина) и РА + ЕF (отечного токсина) приводило соответственно к отеку подкожной клетчатки и быстрой гибели животных.

В этой области исследований за последние несколько лет получены впечатляющие результаты.

Биохимическая характеристика сибиреязвенного (антракс) токсина. Прогресс в области биохимических исследований токсина *Bac.anthraxis* и механизма его патогенетического воздействия на животные клетки во многом связан с работами S.Lerpla (1982-1989). Путем хроматографии на колонках с ДЕАЕ-целлюлозой, гидроксилпатитом и ДЕАЕ-трисакрилом удалось получить в препаративных количествах все 3 компонента токсина в высокоочищенном состоянии, что позволило использовать их как для характеристики функциональной активности, так и для разработки эффективных средств диагностики. Проведен и рентгеноструктурный анализ полученного в кристаллическом виде РА.

В 1982 и 1984 гг. S.Lerpla опубликовал результаты изучения биохимической природы ЕF сибиреязвенного микроба. Автору удалось показать, что ЕF *Bac.anthraxis* вызывает морфологические изменения в монослое культуры клеток яичника китайского хомячка (СНО) и ряда других клеточных линий. Удлинение и повышение уровня сцепления клеток с пластиковой подложкой имело место лишь в случае их комбинированной обработки ЕF и РА. Морфологические изменения сопровождались не менее чем 200-кратным увеличением уровня продукции с АМР в сравнении с исходной концентрацией нуклеотида в необработанных препаратах, причем добавление ингибитора фосфодиэстеразы, 3-изобутилметилксантина приводило к еще большему увеличению синтеза циклического нуклеотида культурой клеток. Кроме того, генерация сАМР наблюдалась только в присутствии как прогретых при 100°C, так и интактных лизатов клеток СНО, что свидетельствовало о каталитической активности термостабильного клеточного материала в процессе синтеза циклического нуклеотида и в свою очередь говорило о том, что ЕF представляет собой аденилатциклазу (АЦ), синтезируемую *Bac.anthraxis* в неактивной форме. В специально поставленных экспериментах было установлено, что АЦ-активность ЕF реализовалась в присутствии эукариотического кальцийсвязывающего белка — кальмодулина. Было также установлено, что активация ЕF кальмодулином имела место лишь в том случае, когда 3-4 сайта последнего, ответственные за связывание ионов металлов, заняты

ионами Ca^{2+} . В случае же использования агента, EGTA, в котором отсутствует ионное содержание ионов Ca^{2+} , *Bac.anthraxis* не проявляет АЦ-активности. Та же зависимость АЦ-активности *Bac.anthraxis* от ионов Ca^{2+} была обнаружена и в культуре клеток избыточных Ca^{2+} . Интересно, что действие АЦ-активности *Bac.anthraxis* на конкурентной культуре клеток перитонеальных макрофагов в присутствии таковой в культуре клеток *E. coli* было отмечено в 1986 г. A.Friedland. Отмеченный факт подтверждает, что ЕF, та же АЦ-активность, точка приложения, что, как и в случае с *Bac.anthraxis*, вызывает цитотоксическое действие Ca^{2+} .

Необходимо также отметить, что ЕF *Bac.anthraxis* вызывает морфологические изменения в монослое культуры клеток яичника китайского хомячка (СНО) и ряда других клеточных линий. Удлинение и повышение уровня сцепления клеток с пластиковой подложкой имело место лишь в случае их комбинированной обработки ЕF и РА. Морфологические изменения сопровождались не менее чем 200-кратным увеличением уровня продукции с АМР в сравнении с исходной концентрацией нуклеотида в необработанных препаратах, причем добавление ингибитора фосфодиэстеразы, 3-изобутилметилксантина приводило к еще большему увеличению синтеза циклического нуклеотида культурой клеток. Кроме того, генерация сАМР наблюдалась только в присутствии как прогретых при 100°C, так и интактных лизатов клеток СНО, что свидетельствовало о каталитической активности термостабильного клеточного материала в процессе синтеза циклического нуклеотида и в свою очередь говорило о том, что ЕF представляет собой аденилатциклазу (АЦ), синтезируемую *Bac.anthraxis* в неактивной форме. В специально поставленных экспериментах было установлено, что АЦ-активность ЕF реализовалась в присутствии эукариотического кальцийсвязывающего белка — кальмодулина. Было также установлено, что активация ЕF кальмодулином имела место лишь в том случае, когда 3-4 сайта последнего, ответственные за связывание ионов металлов, заняты

Молекулярно-генетические исследования сибиреязвенного (антракс) токсина. В 1982 г. M.V. Vassilov и соавт. обнаружили в 1982 г. (рВА1) размером 1700 н.м. термоиндуцибельная способность клеток *E. coli* вызывать гибель клеток *Bac.anthraxis* и вызывать гибель клеток *Bac.anthraxis* в присутствии трансформации Ca^{2+} .

В 1983 г. M.V. Vassilov и соавт. обнаружили в 1983 г. *E. coli* BamHI — фактор, ответственный за гибель клеток *Bac.anthraxis* от ориентации лагало интактной рибосомой гена гичной системы

ионами Ca^{2+} . В случае же добавления в систему *in vitro* хелатирующего агента, EGTA, в концентрациях, незначительно превышающих содержание ионов Ca^{2+} , происходило выраженное ингибирование АЦ-активности. Таким образом было установлено, что EF *Bac.anthraxis* представляет собой активируемую кальмодулином Ca^{2+} -зависимую АЦ.

Интересно, что действие EF ингибировалось добавлением к культуре клеток избыточных концентраций LF, что косвенно свидетельствовало о конкуренции LF и EF за место связывания с РА.

В 1986 г. A.Friedlander показал, что добавление РА и LF к монослою перитонеальных макрофагов приводит к его деструкции при отсутствии таковой в случае использования отдельно взятых РА и LF. Отмеченный факт послужил основанием для выдвижения предположения, что LF, так же как и EF, обладает ферментативной активностью, точка приложения которой, однако, остается невыясненной. Интересно, что, как и в случае с отечным токсином, для реализации цитотоксического действия летального токсина требуются ионы Ca^{2+} .

Необходимо также отметить, что из 3 указанных компонентов токсина лишь иммунизация РА предохраняла лабораторных животных от гибели при их заражении вирулентными штаммами *Bac.anthraxis*, что позволило использовать в ряде стран препараты на его основе в качестве химической сибиреязвенной вакцины.

Молекулярно-генетическая характеристика сибиреязвенного (антракс) токсина. Начало молекулярно-генетических исследований сибиреязвенного (антракс) токсина связано с обнаружением в 1983 г. в клетках возбудителя плазмиды рХ01 (рВА1) размером 176 т.п.н. (P.Miskell et al., N.Robillard et al.) Термоиндуцибельная элиминация репликона приводила к утрате способности клеток *Bac.anthraxis* продуцировать компоненты токсина и вызывать гибель лабораторных животных. Указанные функции восстанавливались после приобретения плазмиды в результате трансформации и конъюгационной мобилизации репликоном рХ01.

В 1983 г. M.Vodkin и S.Leppla клонировали в векторе рВR 322 *E.coli* BamHI – фрагмент ДНК плазмиды рХ01 размером 6 т.п.н., ответственный за синтез РА. Экспрессия РА имела место независимо от ориентации клонированного фрагмента в векторе, что предполагало интактность промоторной области и участка связывания с рибосомой гена *rag*. Вместе с тем ввиду использования негомологичной системы для экспрессии продукция РА рекомбинантными

клонами *E.coli* была снижена в среднем в 10^3 раз в сравнении со штаммами *Bac.anthraxis* и составляла 10 нг/мл культуральной среды, что было малопринемлемо для практических целей. В связи с этим указанный фрагмент ДНК был переклонирован в векторе pUB110 *Bac.subtilis*. В клетках указанного вида бактерий продукция РА даже несколько превышала таковую для *Bac.anthraxis*. Иммунизация морских свинок полученными штаммами предотвращала их гибель при последующем заражении высоковирулентным штаммом Ames в дозе $28LD_{50}$ КОЕ жизнеспособных спор, что позволило рекомендовать рекомбинантные штаммы в качестве живой сибиреязвенной (антракс) вакцины (B.Ivins, 1989).

В 1988 г. S.Welkos et al. определили полную нуклеотидную последовательность участка плазмиды pX01, ответственного за синтез РА. Установлено, что транскрипция гена *rag* *Bac.anthraxis* осуществляется с открытой рамки считывания протяженностью 2319 п.н., кодирующей 735 аминокислотных остатков синтезируемого белка РА. Указанная последовательность нуклеотидов включает в себя участок размером 87 п.н., кодирующий синтез сигнального пептида, очевидно, отщепляющегося в ходе посттрансляционного процессинга. Сайт связывания с рибосомой AAAGGAG располагается на расстоянии 7 п.н. вверх от стартового ATG-кодона. Ориентировочно определена локализация промоторной области гена *lef*, находящаяся на расстоянии 26 п.н. (TATAAT) и 46 п.н. (TTGAAA) вверх от ATG триплета, соответствующая последовательностям «-10» и «-30» сайта связывания РНК-полимеразы *E.coli*. Транскрипция *rag*-области плазмиды pX01 терминируется TAA-кодоном, на 3'-конце которого имеется инвертированный повтор, состоящий из 19 элементарных пар нуклеотидов.

В 1986 г. D.Robertson и S.Leppla сообщили о клонировании в репликоне pUC8 *E.coli* гена *lef*, кодирующего синтез летального фактора *Bac.anthraxis*. MboI-фрагменты плазмиды pX01 размером 6-10 т.п.н. были лигированы в векторе в обеих ориентациях по BamHI-сайту. Об экспрессии гена *lef* в клетках отобранных трансформантов судили по положительной реакции дот-блот-гибридизации с моноклональными антителами к LF и способности ДНК рекомбинантных клонов к гибридизации с синтетическим олигонуклеотидным зондом, сконструированным на основании коллинеарности с последовательностью аминокислотных остатков N-концевого участка белка LF (Gly-His-Gly-Asp-Val). Большинство рекомбинантных клонов продуцировали белок мол.массой 83 кД, мигрирующий при электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ) парал-

дельно с LF. Кроме того, содержащих рекомбинантных клеток приводили макрофагов, что свидетельствует о синтезируемого LF. Э. Э. клонированного фрагмента, результаты проведенного повышения уровня син-индуктора *lac*-оперона, предпринята попытка о-ке клонов рекомбинант-безуспешной.

В 1989 г. D.Robertson и S.Leppla сообщили о клонировании нуклеотидной последовательности участка плазмиды pX01, ответственного за синтез РА. Установлено, что транскрипция гена *rag* *Bac.anthraxis* осуществляется с открытой рамки считывания протяженностью 2319 п.н., кодирующей 735 аминокислотных остатков синтезируемого белка РА. Указанная последовательность нуклеотидов включает в себя участок размером 87 п.н., кодирующий синтез сигнального пептида, очевидно, отщепляющегося в ходе посттрансляционного процессинга. Сайт связывания с рибосомой AAAGGAG располагается на расстоянии 7 п.н. вверх от стартового ATG-кодона. Ориентировочно определена локализация промоторной области гена *lef*, находящаяся на расстоянии 26 п.н. (TATAAT) и 46 п.н. (TTGAAA) вверх от ATG триплета, соответствующая последовательностям «-10» и «-30» сайта связывания РНК-полимеразы *E.coli*. Транскрипция *rag*-области плазмиды pX01 терминируется TAA-кодоном, на 3'-конце которого имеется инвертированный повтор, состоящий из 19 элементарных пар нуклеотидов.

О положительных результатах синтеза EF, бы-Анализируя полученные нов плазмиды pX01, ро-ванного на основе пер-вых 5 аминокислот-белка EF (Met-Asp-Ser) рые гибриды, получены

Рестрикционный анализ pSE42, показал, что ме того, было уста-находится Hind III в со-составе по единствен-ри-дизующийся с вв-фрагмент был клон-несущей в своем со-ф1. Суперинфекция во-дила к образованию поль-зовали в ре-

тельно с LF. Кроме того, ультразвуковые экстракты клеток *E.coli*, содержащих рекомбинантную плазмиду, в отличие от неразрушенных клеток приводили в присутствии РА к деструкции монослоя макрофагов, что свидетельствовало о внутриклеточной локализации синтезируемого LF. Экспрессия гена *lef* не зависела от ориентации клонированного фрагмента в векторе, о чем свидетельствовали результаты проведенного делеционного анализа плазмид и отсутствие повышения уровня синтеза LF при добавлении в ростовую среду индуктора *lac*-оперона, ИПТГ. В цитируемой работе авторами была предпринята попытка обнаружения в сконструированной библиотеке клонов рекомбинантов, синтезирующих EF, которая, однако, была безуспешной.

В 1989 г. D.Robertson и T.Bragg опубликовали результаты определения нуклеотидной последовательности гена *lef*. Согласно полученным данным, синтез белка LF кодируется открытой рамкой считывания протяженностью 2427 п.н., кодирующей 809 аминокислотных остатков белка-предшественника мол. массой 93798 Д. В состав его входит сигнальный пептид (3561 Д), состоящий из 33 аминокислотных остатков. Последовательность Шайна-Дальгарно (AAAGAG) расположена непосредственно перед стартовым ATG-кодоном. О локализации промоторной области авторы не сообщают.

О положительных результатах клонирования гена *суа*, кодирующего синтез EF, было сообщено в 1988 г. M.Tippets и D.Robertson. Анализируя полученную в 1986 г. библиотеку рекомбинантных клонов плазмиды pX01 с помощью олигонуклеотидного зонда, синтезированного на основании коллинеарности с последовательностью первых 5 аминокислотных остатков N-терминальной части зрелого белка EF (Met-Asn-Glu-His-Tyr), авторы обнаружили 3 клона, которые гибридизовались с указанным генетическим зондом.

Рестрикционный анализ ДНК одной из выделенных плазмид, pSE42, показал, что она содержит вставку размером 6,5 т.п.н. Кроме того, было установлено, что в составе клонированного участка находится *Hind* III-фрагмент размером 2,2 т.п.н., имеющий в своем составе по единственному сайту рестрикции для *Xba*I и *Eco*RI, гибридизующийся с вышеуказанным олигонуклеотидным зондом. Этот фрагмент был клонирован в обеих ориентациях в плазмиде pTZ18R, несущей в своем составе межгенную область производного фага M13-f1. Суперинфекция клеток *E.coli*, несущих pTZ18R, фагом M13 приводила к образованию однонитевой плазмидной ДНК, которую использовали в реакции гибридизации с [³²P]-меченым олигонуклео-

тидным зондом. Проведенные эксперименты позволили установить направление транскрипции клонированного в плазмиде pSE42 гена суа. Кроме того, направление транскрипции было подтверждено и в реакции полимеризации с фрагментом Кленова, в которой в качестве матрицы использовали одонитевую ДНК гибридных производных плазмиды pTZ18R.

Однако, несмотря на наличие интактного гена суа в составе плазмиды pSE42, продукция EF клетками *E. coli* не обнаруживалась, что привело авторов к заключению об отсутствии на клонированном фрагменте промотора гена суа. С целью проверки выдвинутого предположения EcoRI-BamHI-фрагмент плазмиды pSE42, кодирующий EF, был клонирован в плазмиде pTZ18R на расстоянии 350 п.н. с 5'-конца от lac-промотора. В результате клетки полученных трансформантов начинали продуцировать EF. Более того, добавление к растущей культуре, несущей данную плазмиду, ИПТГ существенно повышало синтез белка мол. массой 89 кД, идентичность которого EF была подтверждена в реакции иммуноблоттинга с антителами к EF.

Одновременно с цитированными данными были опубликованы результаты работы М. Mock и соавт., в которых авторы также сообщили о клонировании гена суа *Bac. anthracis* в клетках штамма *E. coli* TP10суа⁻, несущих репликон pVUC1 с клонированным в его составе геном синтетического аналога кальмодулина.

Sau3a-фрагменты плазмиды pX01 размером 2-10 т.п.н. встраивали в BamHI уникальный сайт, совместимый с pVUC1 плазмиды pACYC184, и после трансформации отбирали клоны с приобретенной способностью ферментировать мальтозу за счет комплементации гена суа. Была построена рестрикционная карта одной из гибридных плазмид, EcoRV-фрагмент которой размером 5,2 т.п.н., содержащий ген суа *Bac. anthracis*, был переклонирован в обеих ориентациях в отношении lac-промотора плазмиды pUC8. Оба типа сконструированных векторов сохраняли способность к комплементации гена суа после трансформации в клетки штамма *E. coli* TP610 (pVUC1), что предполагало отсутствие контроля синтеза EF со стороны lac-промотора. Использование гибридных плазмид в качестве матриц в системе бесклеточного синтеза (S30) приводило к продукции белка мол. массой 90 кД, дающего положительную реакцию преципитации с сывороткой, полученной в отношении высокоочищенного АЦ *Bac. pertussis*.

В дальнейшем клонированные в векторе pUC8 фрагменты плазмиды pX01, несущие вставку, детерминирующую синтез EF, были

101
СИБИРСКАЯ
секвенированы
Robertson et al.
открытой рамкой
щейся стартовой
предшествующей
(AAAGGAGG)
Bac. subtilis. 3
триплетов, код
группами по а
масса белка-пр
и 92387 Д. Уст
синга образует
же, что ориент
ющая сайт связ
вниз от старто
ной гомологии
Bac. pertussis.
2 других домен
В цитирова
промоторной о
ность, представ
ледовательност
от стартового
зультатами об
и отсутствии э
свидетельству
зой в составе с
ных производн
нить отмеченно
экспрессии кл
штаммов.
Таким обра
синтез компо
вается ряд сх
вательностей
синтез сигнал
Т. Bragg сообщ
ным содержа
летов, кодиру
300 аминокисл
LF обнаружив
ющих собой са

секвенированы обеими группами авторов (V.Escuer et al., 1988, Robertson et al., 1989). Было установлено, что ген *суа* кодируется открытой рамкой считывания протяженностью 2300 п.н., начинающейся стартовым ATG-триплетом, которому на расстоянии 7 п.н. предшествует последовательность Шайна-Дальгарно (AAAGGAGGT), комплементарная 3'-ОН-концу 16S РНК *Bac.subtilis*. За кодоном ATG следует последовательность из 33 триплетов, кодирующих сигнальный пептид. Вычисленная обеими группами по аминокислотной последовательности молекулярная масса белка-предшественника EF составляла соответственно 92464 и 92387 Д. Установлено, что в ходе посттрансляционного процессинга образуется зрелый белок мол. массой 88808 Д. Показано также, что ориентировочная последовательность нуклеотидов, кодирующая сайт связывания EF с АТР, находится в положении «346-397» вниз от стартового кодона. Этот домен характеризуется выраженной гомологией с аналогичной последовательностью гена *суа* *Bac.pertussis*. Кроме того, сообщается о наличии в составе гена *суа* 2 других доменов меньшей степени гомологии.

В цитированных работах не приводятся данных о локализации промоторной области гена *суа* *Bac.anthraxis*. Вместе с тем идентичность, представленная обеими группами авторов, нуклеотидных последовательностей протяженностью по меньшей мере 40 п.н. вверх от стартового кодона наряду с приведенными M.Mock et al. результатами об экспрессии клонированного гена *суа* в клетках *E.coli* и отсутствии зависимости его экспрессии от ориентации в векторе свидетельствуют о наличии участка связывания с РНК-полимеразой в составе секвенированного фрагмента использованных гибридных производных плазмиды рUC8. Единственное, чем можно объяснить отмеченное расхождение, это, по-видимому, использование для экспрессии клонированных фрагментов различных реципиентных штаммов.

Таким образом, в структуре генетических локусов, кодирующих синтез компонентов токсина сибиреязвенного микроба, прослеживается ряд сходных черт, выражающихся в идентичности последовательностей Шайна-Дальгарно и наличии участков, кодирующих синтез сигнальных пептидов. Кроме того, в 1989 г. D.Robertson и T.Bragg сообщили, что все 3 детерминанты характеризуются сходным содержанием GC-пар (29-31%) и отсутствием содержания триплетов, кодирующих цистеин. Отмечено также, что в составе первых 300 аминокислотных остатков N-концевых фрагментов белков EF и LF обнаруживается не менее 5 зон гомологии, очевидно, представляющих собой сайт связывания с РА.

Механизм действия сибиреязвенного (антракс) токсина. До последнего времени оставался не вполне ясным вопрос о механизме взаимодействия РА, LF и EF с животными клетками, расшифровка которого могла бы во многом способствовать пониманию интимной природы патогенетического действия сибиреязвенного (антракс) токсина. Существенные успехи в этом направлении были достигнуты с началом использования культур эукариотических клеток.

В 1989 г. опубликованы результаты работ, в которых выявлены существенные различия в чувствительности к летальному токсину различных линий макрофагов и исследованы этапы его взаимодействия с последними (A. Friedlander et al., 1989; V. Sing, S. Leppla et al., 1989). Изучение процесса связывания меченого РА с обоими типами клеточных культур позволило установить наличие на каждом из них высокочувствительных рецепторов (константа ассоциации 10^{-9} M^{-1}), причем как на чувствительных, так и на резистентных клетках было обнаружено около 30000 указанных структур.

Параллельно было установлено, что связывание РА с рецепторами обоих типов клеток сопровождается протеолитическим отщеплением 20 кД N-концевого фрагмента (РА20) с образованием белка мол. массой 63 кД, получившего в связи с этим название РА63. Скорость связывания меченого LF как с чувствительными, так и резистентными клетками была значительно выше в случае их преинкубации с РА63, нежели с РА83.

Проведенный анализ последовательностей аминокислотных остатков показал, что расщепление исходного белка происходит в уникальном трипсинчувствительном сайте РА83 в положении arg-167.

Авторами также сконструирован челночный вектор, несущий ген *rag*, в котором посредством сайтспецифического мутагенеза делетированы триплеты, кодирующие 6 аминокислотных остатков трипсинчувствительного сайта РА83. Введение гибридной плазмиды в клетки *Bac. subtilis* приводило к синтезу устойчивого к обработке трипсином РА, полностью сохраняющего способность к связыванию с рецепторами клеточной стенки, но не вызывающего в сочетании с LF деструкции монослоя перитонеальных макрофагов (S. Leppla, 1989).

Интересно, что протеолитическая конверсия РА83 наблюдалась не только в результате его взаимодействия с макрофагами. J. Ezzel и T. Abshire установили, что при выращивании *Bac. anthracis* на средах с добавлением свежей сыворотки РА обнаруживается исключи-

103
тельно в форме 63
авторами в сыворот
рованных очищен
цепление белка т
сайте. Вместе с те
ментов показал
ровано также о
(LF-РА) как в си
важных морских
Приведенные
ракс) токсин к
ных) токсинов, м
вается в рамки та
для токсинов С
гих (Ю.В.Езепч
(от англ. binding
олитически акти
литической, акт
полное подтвер
которые показа
мом *Bac. anthrac*
тате опосредова
приводит к пол
ных животных
Указанная
- транслокаци
взаимодействи
Первые свед
в животные кл
Автору удалос
фагам мыши N
трансмембран
тозных везику
действия лета
культуры кле
цитохлазин Г
досом (NH_4SCl
отношению к
посредственн
кации леталь

тельно в форме 63 кД белка. Кроме того, наличие РА63 выявлено авторами в сыворотке крови как инфицированных, так и иммунизированных очищенным РА83 морских свинок. Установлено, что расщепление белка также осуществляется в трипсинчувствительном сайте. Вместе с тем проведенный ингибиторный анализ обоих ферментов показал существенные их различия. Авторами зарегистрировано также образование высокомолекулярных комплексов (LF-РА) как в системе *in vitro*, так и в сыворотке крови инфицированных морских свинок.

Приведенные данные позволяют отнести сибиреязвенный (антракс) токсин к категории известных бифункциональных (бинарных) токсинов, механизм действия которых в полной мере укладывается в рамки так называемой А-В-структурной модели, описанной для токсинов *Cl.tetani*, *V.cholerae*, *C.diphtheriae* и некоторых других (Ю.В.Езепчук, 1985; I.Freer, 1988). В качестве В-субъединицы (от англ. binding – связывание) в данном случае выступает протеолитически активированный РА, а в качестве субъединицы А (каталитической, активной) – LF или EF. Данное заключение находит полное подтверждение в недавних опытах A.Cataldi и F.Labruyere, которые показали, что заражение лабораторных животных штаммом *Bac.anthraxis Sterne*, продуцирующим лишь EF и LF, в результате опосредованной инсерционным мутагенезом делеции гена *rag* приводит к полной утрате вирулентности культуры для лабораторных животных.

Указанная модель предполагает наличие и последующих этапов – транслокации эффекторных остатков токсина в цитозоль и их взаимодействие с внутриклеточной мишенью.

Первые сведения о процессе проникновения токсина *Bac.anthraxis* в животные клетки были опубликованы в 1986 г. A.Friedlander. Автору удалось показать, что добавление к перитонеальным макрофагам мыши NH_4Cl и мопензима, химических агентов, изменяющих трансмембранный градиент ионов H^+ и поднимающих рН эндотозных везикул, приводит к полной, но обратимой защите клеток от действия летального токсина. В 1988 г. V.Gordon et al. на модели культуры клеток СНО также показали, что ингибитор эндоцитоза, цитохлазин D и соединения, предотвращающие ацидификацию эндосом (NH_4Cl и хлороквин), оказывают аналогичное действие по отношению к отечному токсину *Bac.anthraxis*, что доказывало непосредственную задействованность эндоцитоза в процессе транслокации летального и отечного токсинов в клетки-мишени.

Вместе с тем в 1989 г. T.Koehler et al. установили, что добавление РА63 (но не РА83, РА20, LF или EF) к плоским фосфолипидным мембранам приводит к образованию ионпроводящих каналов, подобных тем, что образуются при контакте мембран со столбнячным, ботулиническим и дифтерийным токсинами (D.Noch et al., 1985). По-видимому, процессы повышения проводимости мембран и эндоцитоза взаимосвязаны в цепи событий, приводящих в конечном счете к поступлению антракс токсина в цитозоль, хотя конкретная роль каждого звена требует дальнейшего выяснения.

В 1989 г. появились сообщения о том, что введение в клетки чувствительных макрофагов LF в отсутствие РА методом осмотического лизиса пиносом (C.Okada et al., 1982) приводило к деструкции их монослоя. В случае с резистентными макрофагами подобного эффекта не наблюдалось. Вместе с тем для реализации цитотоксического эффекта требовалась достаточно высокая концентрация LF – 50 мкг/мл в отличие от 0,001 мкг/мл, необходимой в случае сочетанной обработки макрофагов LF и РА. Последнее обстоятельство не позволяет исключить вероятность конверсии LF в активную форму, либо в ходе эндоцитоза, либо в результате воздействия внутриклеточных ферментов.

Тем не менее приведенные данные однозначно свидетельствуют о том, что цитотоксическое действие летального токсина *Bac.anthraxis* подобно действию Шига-токсина, экзотоксина псевдомонад и токсина *Cl.difficile* (K.Sandvig et al., 1986) реализуется на уровне внутриклеточной мишени, природа которой остается неизвестной.

Вместе с тем опубликованные недавно данные (R.Bhatnagar et al., 1989) позволяют с большей определенностью предполагать механизм поражающего действия летального токсина на животные клетки. Авторами установлено, что аналогично действию дифтерийного токсина (K.Sandvig et al., 1982), экзотоксина А и цитотоксина псевдомонад (D.Fitzgerald et al., 1982; T.Sasaki et al., 1985), Шига-токсина, а-токсина стафилококков, энтеротоксинов *Cl.perfringens* и некоторых растительных токсинов цитотоксическое действие летального токсина *Bac.anthraxis* реализуется исключительно в присутствии ионов Ca^{2+} . Показано, что Ca^{2+} необходим как на этапах связывания и протеолитической конверсии РА на клеточной стенке, так и на этапах, следующих за интернализацией токсина в клетки-мишени, причем взаимодействие токсина с клетками вызывает резкое нарастание аккумуляции последними ионов Ca^{2+} , избыток которых в цитозоле, как известно, является основным фактором, приводящим к гибели клеток (I.Farber, 1981; S.Orrenius et al., 1986; F.Schanne et

al., 1979). Механизм индуцированного токсином Ca^{2+} -опосредованного поражения клеток может, по-видимому, включать в себя активацию ряда кальцийзависимых ферментов, включая эндонуклеазы, протеазы и фосфолипазы.

Экспериментальные сведения о механизме токсического действия избыточных концентраций сАМР в клетках различных биологических объектов позволяют с определенной степенью достоверности предполагать молекулярный механизм повреждающего действия отечного токсина. Возможность проведения таких аналогий в значительной мере обусловлена цитированными данными о наличии в составе генов суа *Bac.anthraxis* и *Bac.pertussis* районов выраженной гомологии. Указанная область АЦ *Bac.pertussis* является частью активного центра фермента. Установлено также серологическое родство синтетических пептидов, синтезированных на основании коллинеарности указанных участков генов суа *Bac.anthraxis* и *Bac.pertussis* с АЦ мозга крысы (S.Goyard et al., 1989).

Повышение внутриклеточного уровня сАМР может приводить к токсическому эффекту, выражающемуся в обезвоживании клеток и экскреции источников энергии в результате нарушения их проницаемости (H.Masure et al., 1987), как это наблюдается в случае с холерным токсином, опосредующим генерацию сАМР энтероцитами. Обезвоживание же энтероцитов, очевидно, имеет общую природу как с образованием мукоидного экссудата в легких при коклюшной инфекции, так и с отеком тканей, наблюдающимся в процессе развития сибиреязвенной инфекции.

Сибиреязвенный токсин оказывает влияние и на некоторые звенья антибактериального ответа, реализуемого форменными элементами крови человека. Так, повышение уровня сАМР в нейтрофилах, обусловленное контактом последних с отечным токсином, сопровождалось ингибированием фагоцитирующей функции.

В 1985 г. B.Wade et al. сообщили, что отечный и летальный токсины стимулируют хемотаксис нейтрофилов. По-видимому, указанный эффект реализуется на уровне еще не идентифицированного общего звена, регулирующего или координирующего взаимодействие обоих токсинов с нейтрофилами, поскольку ни один из отдельно взятых компонентов токсина не оказывал подобного действия, в то время как стимулирующие генерацию сАМР в полиморфно-ядерных лейкоцитах токсины *V.cholerae*, *B.pertussis* и термолabile энтеротоксин *E.coli* угнетали хемотаксическую функцию исследуемых клеток.

Исследованиями, проведенными в той же лаборатории, было установлено, что добавление отечного или летального токсинов к нейтрофилам резко угнетало процесс, известный под названием прайминга (G.Wright et al., 1988). Под праймингом понимают ответ со стороны полиморфно-ядерных лейкоцитов и макрофагов на их обработку липополисахаридами (ЛПС) или их синтетическими аналогами и выражающийся в продукции небольших количеств O_2 и стимуляции процесса экзоцитоза гранулоцитами. Прайминг-эффект является типичным ответом фагоцитов на контакт с бактериальными клетками. Авторам удалось показать, что механизм ингибирования указанного процесса сибиреязвенным токсином заключается в угнетении стимулирующего действия на нейтрофилы прайминг-белка, синтезируемого тромбоцитами при контакте с ЛПС.

Несмотря на разнообразие и неоднородность изменений, вызываемых обоими компонентами сибиреязвенного токсина, в их основе лежат единые регуляторные механизмы. Так, недавно было показано, что кальмодулин необходим не только для активации АЦ Вак.anthraxis, но и для реализации цитотоксического действия летального токсина, что позволяет рассматривать этот белок в качестве общего фактора, возможно, сопрягающего и координирующего действие обоих компонентов токсина Вак.anthraxis, фактора, конкретная роль которого требует дальнейшего уточнения.

Кроме того, последние результаты J.Bartkus и S.Leppla о регуляции синтеза всех 3 белковых компонентов сибиреязвенного токсина на уровне транскрипции посредством CO_2 , а также данные об ингибировании бикарбонатом процесса спорообразования и стимуляции чувствительности культур Вак.anthraxis к лизоциму наряду со сведениями S.Makino et al. о наличии на плазмиде рХ02 регуляторных генов, обуславливающих CO_2 -зависимую продукцию капсулы, свидетельствуют о том, что CO_2 может выступать в качестве фактора, осуществляющего координированную регуляцию детерминантов патогенности Вак.anthraxis. По данным A.Fouet, I.Sirard и M.Mock (1996), синтез трехкомпонентного антракс токсина и капсулы зависел от присутствия бикарбоната/ CO_2 . Они показали, что гены трех компонентов токсина в равной степени регулируются бикарбонатом и температурой. Такого рода регуляция описана для целого ряда генов патогенности многих бактериальных видов.

Обсуждая вопрос о механизмах патогенетического воздействия антракс токсина на животные клетки, нельзя кратко не остановиться на опубликованных недавно результатах исследований, посвященных изучению инфекционной чувствительности лабораторных

животных (S. Welkos et al., 1988-1989). Исследование различных линий лабораторных животных (мышей) позволило разделить их на 2 основные группы, различающиеся по восприимчивости к заражению токсигенным бескапсульным штаммом сибиреязвенного микроба Sterne ($LD_{50} - 10^4$ и 10^4 КОЕ жизнеспособных спор соответственно). Посредством заражения обоих типов животных и полученного в результате их скрещивания потомства было установлено, что устойчивость к инфекции ассоциирована с интактностью Нс-гена, кодирующего синтез С5-компонента системы комплемента. Последний, как известно, является основным хемоаттрактантом фагоцитирующих лейкоцитов в сыворотке крови и осуществляет, кроме того, активацию процессов дегрануляции, антителообразования и некоторых других функций этих клеток (D. Chenoweth et al., 1983). Сравнительное изучение характера воспалительного процесса показало, что у чувствительных животных в отличие от резистентных удлиняются сроки притока полиморфно-ядерных лейкоцитов и макрофагов и снижается количество последних в зоне подкожного введения споровой суспензии. Кроме того, нейтрофилы чувствительных животных характеризовались меньшей степенью выраженности *in vitro* хемотаксического ответа. Вместе с тем фагоцитирующая функция макрофагов и нейтрофилов обоих видов животных не была нарушена, что свидетельствовало о корреляции чувствительности лишь с локальным характером развития событий, обусловленных неспецифическими факторами иммунитета. Приведенные данные лишней раз свидетельствуют о неоднородности механизмов, лежащих в основе ответа макроорганизма на воздействие инфекционного агента и синтезируемого им токсина (Ю. В. Езепчук, 1985). Очевидно, что степень выраженности такого рода различий должна существенно возрастать при инфекционном процессе, вызванном культурами *Bac. anthracis*, несущими, помимо репликона $pX01$, и другие детерминанты патогенности, к числу которых в первую очередь относятся продукты, кодируемые плазмидой капсулопродукции, $pX02$, поскольку известно, что капсула обеспечивает выраженную защиту возбудителя от фагоцитоза (S. Makino et al., 1989). Кроме того, полученные недавно данные о высокой вирулентности штаммов, несущих в своем геноме лишь плазмиду $pX02$ (С. А. Еремин и др., 1989; А. С. Степанов и др., 1989), а также о вовлечении в реализацию патогенных свойств микроба еще не идентифицированных хромосомальных генов свидетельствует о том, что токсин *Bac. anthracis* является одной из составляющих комплекса факторов микроорганизма, принимающих участие в реализации его патогенных свойств.

После ознакомления с работами по изучению сибиреязвенного токсина, выполненными 10 лет тому назад, можно проанализировать работы, которые были опубликованы в последние годы.

R.Liddington et al. (1998) провели кристаллографическое изучение летального токсина *Bac.anthraxis*. Они определили кристаллическую структуру РА в мономерной и гептамерной формах. Оказалось, что она не имеет сходства с другими бактериальными токсинами и определяет новый структурный класс. Летальный фактор является каталитическим компонентом летального токсина *Bac.anthraxis*.

Кристаллическую структуру рекомбинантного протективного антигена в сравнении со структурой дикого типа изучали J.Miller et al. (1998). Они описали продукцию, очистку и протективную эффективность рекомбинантной формы протективного антигена (РА), экспрессированного в *Bac.subtilis* WB600 (pРА101), который показал высокие потенциальные возможности в качестве кандидата для альтернативной вакцины. Сравнивая кристаллическую структуру рРА с таковой дикого штамма, обнаружили небольшое различие в положении атомов и высокую корреляцию между термическими В факторами. Авторы считают, что рРА рекомбинантного штамма и РА дикого типа имеют идентичные структуры.

Воздействие летального токсина *Bac.anthraxis* подробно рассматривается в целом ряде опубликованных статей. В частности, Ph.Nanna (1998) указывает, что после проникновения спор антракса в организм происходит их размножение, рост вегетативных клеток и экспрессия летального токсина и других факторов вирулентности. Летальный токсин *Bac.anthraxis* (LeIх) является ответственным за большинство патологий, наблюдаемых при системной сибиреязвенной инфекции.

Инъекция стерильного LeIх подопытным животным проявляется в виде шока и внезапной смерти, как это происходит в течении активных бактериальных инфекций. При заражении в организме сразу накапливается LeIх в высокой концентрации. Разрушение бактерий при применении антибиотиков чаще всего не приносит успеха. Считается, что LeIх секретируется в кровяное русло и свободно циркулирует по организму, проникая в клетки хозяина. Непосредственно в цитоплазме летальный токсин действует как цинк-металлопротеаза, нарушая нормальные гомеостатические функции. Макрофаги являются уникально чувствительными типами клеток, которые, по-видимому, служат жизненными глобальными медиаторами патологий, индуцируемых токсинами.

Патогенное действие сибиреязвенного токсина и происходящие при этом морфологические и функциональные изменения изучали Е.Е.Тофельштейн и Е.Р.Голубинский (1998). Исследования этих авторов и их коллег освещены в отечественной периодической научной печати (ЖМЭИ, 1986, 1987, 1989, 1990). В экспериментах на лабораторных животных (белых крысах линии Фишер-344) они установили, что смертельная сибиреязвенная инфекция по патоморфологической картине в значительной мере соответствует признакам действия сибиреязвенного токсина с характерными нарушениями микроциркуляции, дистрофическими изменениями и явлениями сосудисто-легочной недостаточности при весьма умеренно выраженных проявлениях инвазии возбудителя. На основании общности патоморфологических проявлений действия сибиреязвенного токсина и сибиреязвенной инфекции авторы подтверждают значение сибиреязвенного токсина как важного фактора патогенности возбудителя.

В вышеупомянутой статье Е.Е.Тофельштейн и Е.Р.Голубинский (1998) указывают, что патогенное действие сибиреязвенного токсина, состоящего из протективного антигена, летального и отечного факторов, зависит от LF активности. Многие клетки организма обладают рецептором РА, взаимодействуют с EF, но не реагируют на LF. Только мононуклеарные фагоциты (Mph) подвергаются цитолизу *in vitro* после связывания РА с мембраной и перемещения комплекса «рецептор – $РА_{65}$ – LF» в цитоплазму ($РА_{65}$ – COOH – это терминальный 65 килодальтон фрагмент протективного антигена).

Авторы формулируют гипотезу относительно АТ фиксации альвеолярными Mph *in vivo* на основании следующих экспериментальных данных:

1) поражение эндотелиальных клеток, отек легких и нарушение диффузии O_2 через воздушно-кровяной барьер вызывает гибель крыс Фишер-344, чувствительных к АТ;

2) Mph секретирует O_2 катализирует токсические продукты (H_2O_2 , O_2 , OH), предшествует отеку легких при различных патологических состояниях;

3) $РА + LF$ *in vitro* вызывает активизацию H_2O_2 -глутатионпероксидазы и аккумуляцию H_2O_2 , O_2 , OH в перитонеальных Mph BALB/с мышей, чувствительных к АТ.

По мнению авторов, нарушение диффузии O_2 на участке «капилляр – кровь – клетка» при сибиреязвенной интоксикации (неминуемая стадия процесса) сопровождается изменением энергетического уровня *in vitro*.

От взаимодействия протективного антигена и летального фактора токсина *Bac.anthraxis* зависит цитотоксичность этого токсина. По данным Y. Sigh и S.Lerpla (1998), в процессе цитотоксичности РА связывается с поверхностным клеточным рецептором и LF транслоцируется в цитозоль клеток. Протеолитическое расщепление РА (83 кДа) для генерирования РА63 (63 кДа) является существенным условием биологической активности летального антракс токсина.

В другой работе те же авторы (S.Lerpla et al., 1998) пишут, что главную роль, которую играет токсин в патогенезе антракса, является то, что токсин эволюционировал в эффективную систему для переноса его двух каталитических белковых компонентов – фактора отека и летального фактора в цитозоль клеток хозяина. Эта система включает связь компонента токсина протективного антигена с убиквитарным (но еще не идентифицированным) рецептором протеолитической активности на клеточной поверхности, интернализацию эндоцитозом, транслокацию через раннюю мембрану в цитозоль.

R.Pellizari et al. (1998) изучали влияние действия летального токсина (LeIх) на линию клеток макрофагов. *In vitro* LeIх индуцирует цитолиз в различных клеточных линиях макрофагов, что позволяет авторам утверждать, что они являются клетками-мишенями также и *in vivo*.

Подробно рассматривается этот вопрос в статье А.С.Степанова и S.Lerpla (1996), название которой авторы сформулировали следующим образом: «Макрофаги убиваются плазмидо- и хромосомально-кодированными факторами, синтезированными *Bac.anthraxis* внутри клетки хозяина и вне ее». Авторы считают, что взаимодействие летального токсина и фагоцитов животного играет центральную роль в вызывании серьезных симптомов сибирской язвы и летальности.

По данным этих авторов, «макрофаги являются мишенью для сложного воздействия обоих хромосомально- и плазмидо-кодированных факторов вирулентности. Хромосомально закодированные детерминанты, начиная действовать вне- и внутриклеточно на начальных этапах болезни, ведут к смерти макрофагов. Плазмидо-закодированный летальный токсин и капсула, синтезированные активно растущими фагоцитированными бациллами, при определенных условиях, оказываются, действуют главным образом внутриклеточно, значительно снижая жизнеспособность макрофагов». Эти данные показывают решающую роль бактериального фагоцитоза на начальных стадиях патогенеза сибирской язвы, где фагоциты могут служить в качестве резервуара для аккумуляции, размножения и

рассеивания микроорганизма по телу, играя, таким образом, роль в установлении и последующем прогрессировании болезни. На конечных этапах болезни аккумулярованные и освобожденные токсины играют первичную роль.

Учитывая, что летальный антракс токсин является цитолитиком для отдельных первичных макрофагов и клеточных линий макрофагов и ингибирует рост других типов клеток *in vitro*, A. Friedlander (1998) изучил противоопухолевое действие летального токсина *in vivo* на мышах. Для этой цели была использована линия макрофагоподобных клеток, выделенных из клеток саркомы ретикулома мышцей. Развившиеся подкожные опухоли обрабатывали прямой инъекцией летального токсина.

Значительную ингибицию роста опухоли наблюдали после пяти ежедневных инъекций. Автор считает, что летальный фактор *Bac. anthracis* может оказаться полезным при лечении опухолей при прямом его введении в опухолевые клетки-мишени, которые обладают поверхностными антигенами или рецепторами, способными к переносу токсина в цитозоль.

S. Leppla, A. Friedlander, Y. Singh, E. Cora, R. Bhatnagar (1990) изучали токсическое действие *Bac. anthracis* на клеточном уровне с помощью модели. Изучение *in vitro* показало, что РА фрагмент 63-кД С-терминала имеет высокое сродство ($K_d 10^{-10}$ М) с двумя другими компонентами токсина — летальным и отежным факторами. Использовали радиойодированные РА и LF, чтобы показать, что клетки обладают единственным классом рецепторов. Протективный антиген, который связан со своим рецептором, расщепляется поверхностной клеточной протеазой на аргинин-167, высвобождая 20-кД фрагмент N-терминала и выставляя сайт, к которому прикрепляются LF или EF. Этот комплекс интернализируется, вероятно, эндоцитозом, чтобы доставить LF или EF в цитозоль.

Позднее S. Leppla et al. (1996) описывают взаимодействие антракс токсина с клетками млекопитающих. Они пишут, что три белка токсина: протективный антиген (РА, 82 КДа), отежный фактор (EF, 90 КДа) и летальный фактор (LF, 90 КДа) взаимодействуют в парных комбинациях для получения двух токсических активностей. РА связывается с неидентифицированным рецептором, присутствующим на поверхности большинства типов клеток млекопитающих, и расщепляется на одном сайте клеточно-поверхностной протеазой. Карбоксил-конечный 63 КДа фрагмент (РА 63) остается связанным с клеточной поверхностью. РА 63 (но не нативным РА) имеет сайт высокого сродства, с которым связываются LF и EF.

Затем комплекс входит в клетки посредством эндоцитоза. Ацидификация эндосом заставляет РА 63 вставляться в мембрану и образовывать олигомерную структуру, которая составляет протеин-кондуктивный канал. Оказывается, что LF и EF утилизируют эту структуру для транслокации в цитозоль, где они экспрессируют каталитические активности, вызывающие токсичность. Установлено, что EF является аденилатциклазой, а LF - металлопротеазой.

В исследованиях J.Ezzell, T.Abshire, Ch.Brown (1990) относительно экспрессии антигена *Bac.anthraxis* в инфицированном хозяине было показано, что РА компонент антракс токсина обнаруживается в крови, как 63 - кД белок, связанный с компонентом летального фактора. Конверсия протективного антигена из 83 в 63 - кД была катализована кальций-зависимой, тепло-лабильной сывороточной протеазой, которая оказывается повсеместной среди широкого круга видов животных.

Работа T.Koehler, R.Blaustein, A.Finkelstein, R.Collier (1990) посвящена изучению взаимодействия протективного антигена с мембранами клеток. По мнению авторов, РА компонент антракс токсина играет центральную роль в проявлении интоксикации. Он взаимодействует с мембранным рецептором; подвергается протеолитической обработке; является посредником между эндоцитозом и последующей транслокацией других белков токсина, EF и LF в цитозоль. Путь, по которому токсин, связанный с клеточной поверхностью, достигает цитоплазмы, не известен, но можно предположить, что токсину требуется проход через кислотный эндоцитозный пузырек.

РА можно разделить на два фрагмента - РА₆₅ (Mr 65000) и РА₂₀ (Mr 20000) с помощью трипсинолизиса. Добавление очищенного РА₆₅ к плоским фосфолипидным двойным слоям давало резкое увеличение проводимости мембраны. Образование ион-проводящего канала является первым примером трансмембранного эффекта, опосредованного протективным антигеном. Генетическое изучение экспрессии антракс токсина проведено A.Cataldi, E.Labruyere (1996). Авторы разработали для введения рекомбинантных плазмид в *Bac.anthraxis* гетерограмную (перенос между грамположительными и грамотрицательными бактериями) конъюгационную систему переноса между *E.coli* и *Bac.anthraxis*.

Используя эту процедуру, была сконструирована производная штамма Sterne *Bac.anthraxis*, производящая только летальный фактор и аденилатциклазу. Споры из этого штамма потеряли свою летальную активность на мышах при подкожной инъекции, а повторные инъекции не защищали мышей от контрольного заражения 10⁶ спорами штамма Sterne дикого типа.

113
Следовательно
нии патогенности
Таким образом
лентность *Bac.*
зом состоящего
поли-Д-глутами
которых располо
(А.С.Степанов,
детерминанты в
пе в патогенезе
указывают такж
ров в вирулент
и их первичны
Упомянутые
для морских с
мов. Единстве
штаммами низк
глобулин (Арг
ная способнос
теристики опр
На основан
хромосомальн
Bac.anthraxis
который, как
ют в макрофа
В другой с
(1996) показа
лентности *Bac.*
лю они сравн
мов *Bac.anthra*
ные сибиреяз
метионина в
Был использо
с помощью т
Приобретение
увеличение
ные внутри и
мосомы, несущ
шей.
И

Следовательно, РА является важным компонентом в проявлении патогенности и иммуногенности сибиреязвенного микроба.

Таким образом, по мнению большинства исследователей, вирулентность *Bac.anthraxis* преимущественно ассоциируется с синтезом состоящего из трех частей экзотоксина и g-связанной капсулы поли-Д-глутаминовой кислоты, структурные и регуляторные гены которых расположены на плазмидах pX01 и pX02 соответственно (А.С.Степанов, К.Klimpel, S.Lerpla, 1996). Предполагается, что обе детерминанты вирулентности участвуют в макрофаг-связанном этапе в патогенезе сибирской язвы. Последние исследования, однако, указывают также на включение хромосомно-кодированных факторов в вирулентность *Bac.anthraxis*. Однако природа этих факторов и их первичные мишени остаются пока неясными.

Упомянутые авторы установили 10-1000-кратные различия в LD₅₀ для морских свинок у капсуло- и токсин-продуцирующих штаммов. Единственными отличительными характеристиками между штаммами низкой вирулентности были их неспособность разлагать глобулин (Apg) верхнего слоя субстрата и их значительно сниженная способность разлагать другие белковые субстраты. Эти характеристики определяются хромосомными локусами.

На основании проведенных исследований авторы считают, что хромосомально-кодированная экстрацеллюлярная протеаза *Bac.anthraxis* может рассматриваться как фактор вирулентности, который, как и плазмидо-кодированный токсин и капсула, участвуют в макрофаг-связанном этапе патогенеза сибирской язвы.

В другой статье А.С.Степанов, Н.И.Микшис, М.Ф.Болотникова (1996) показали роль хромосомно-кодированных факторов в вирулентности *Bac.anthraxis* для мышей и морских свинок. С этой целью они сравнили аминокислотные требования для роста 48 штаммов *Bac.anthraxis* и 24 близкородственных штаммов. Все испытанные сибиреязвенные штаммы оказались полностью зависимыми от метионина в комбинации с одним или другим источником азота. Был использован штамм *Bac.cereus* в качестве донора Met⁺ локуса с помощью трансдукции в штамм *Bac.anthraxis* как реципиента. Приобретение штаммами Met⁺ и Met⁻ приводило к 10-кратному увеличению LD₅₀ для мышей. Таким образом, локусы, расположенные внутри или тесно связанные с Met-регионом *Bac.anthraxis* хромосомы, несут гены, отвечающие за вирулентность бацилл для мышей.

Из отечественных работ можно отметить статью Н.И.Микшис, С.А.Еремина, М.Ф.Болотниковой (1999). Авторы изучали корреля-

цию вирулентности *Bac. anthracis* с экспрессией признаков, кодируемых хромосомными генами. В результате клонального анализа сибиреязвенных штаммов выявлена гетерогенность большинства популяций по степени выраженности протеолитической, гемолитической и пигментсорбирующей активности. Изолированные внутри каждой популяции фенотипы разделены на 4 субпопуляции. Появление субпопуляций вирулентных штаммов и вакцинных – Sterne, Ценковского – обусловлено способностью клонов, сорбирующих конго красный и обладающих высокой активностью протеолитических, гемолитических ферментов, диссоциировать с образованием фенотипов с различной экспрессией признаков протеолиза, гемолиза, пигментсинтеза и спорообразования.

Выявлена отличительная особенность вакцинных штаммов СТИ-1, Wright, Pasteur – относительная однородность их популяций, состоящих в основном из клеток с низкой активностью протеолитических, гемолитических и пигментсорбирующих ферментов.

На основании изучения гетерогенности ди-, моно- и бесплазмидных производных штаммов возбудителя сибирской язвы авторы делают вывод об отсутствии непосредственного влияния собственных плазмид на процесс формирования различных фенотипов. Определение вирулентности клонов, выделенных из высоковирулентного штамма *Bac. anthracis* 81/1, показало, что процессы, сопряженные с утратой способности к спорообразованию, ведут к значительному снижению вирулентности для лабораторных животных.

Из отечественных работ по изучению токсина *Bac. anthracis* следует упомянуть опубликованные в периодической печати статьи А.Н. Носкова, Т.Б. Кравченко, В.П. Носкова (1996), которые изучали функционально-активные домены в молекуле протективного антигена сибиреязвенного экзотоксина. Оказалось, что молекула протективного антигена состоит из 4-х функционально активных доменов. Это было выявлено с помощью ограниченного протеолиза. Экранирующий домен занимает область в линейной структуре молекулы РА с NH_2 -конца до -Lys 166 и играет ведущую роль в протеолитической активации РА. Ассоциативный домен, располагающийся в области Arg 167 – Met 266, ответствен за взаимодействие с летальным фактором при самосборке токсических комплексов летального или отежного токсина. Стабилизирующий домен занимает в линейной структуре молекулы область с Gly 351 до Met 434. По мнению авторов, эта область, с одной стороны, способствует формированию с летальным фактором конформационно устойчивых токсических комплексов, а с другой стороны, она принимает участие

115
в формировании
мишени попадае
видимому, часть
ассоциативный
COOH – терм
осуществляет в
макрофагах и т
ки-мишени.

В другой ст
торы описыва
тивных домен
экзотоксина. С
имеется 3 фун
молекулы. Ас
Met 242, «стаб
торный домен

С.Еремин и
прессии на
Bac. anthracis.
кциональную
которая опред
этой целью те
ма 81/1 и его
плазмид.

Результат
сорбции окта
щие рХ02, об
ровать октан.

Когда кле
ствии бикарб
любую способ
ную природу
тный штамм
присутствие

Споры ва
18 mv. В теч
проводился
ляция состоя
ния логарифм
до 25 mv.

в формировании гидрофобного канала, по которому внутрь клетки-мишени попадает молекула летального или отечного фактора и, по-видимому, часть молекулы РА (от Arg 167 до Gly 314), включающая ассоциативный домен. Рецепторный домен, представляющий собой СООН – терминальную область, начиная с аминокислоты Leu 663, осуществляет взаимодействие со специфическими рецепторами на макрофагах и тем самым доставляет токсический комплекс до клетки-мишени.

В другой статье, опубликованной в этом же журнале (1996), авторы описывают исследования по выявлению функционально активных доменов в молекуле летального фактора сибиреязвенного экзотоксина. Они установили, что в молекуле летального фактора имеется 3 функционально активных домена в линейной структуре молекулы. Ассоциативный домен занимает область от Lys 39 до Met 242, «стабилизирующий» домен – от Leu 517 до Lys 614, эффекторный домен – далее, до СООН-терминальной аминокислоты Lys.

С.Еремин и И.Дятлов (1996) изучили влияние плазмидной экспрессии на электрокинетический потенциал (ЕКР) клеток *Bac.anthraxis*. Электрокинетический потенциал характеризует функциональную проводимость поверхности бактериальных клеток, которая определяет экспрессию их патогенных характеристик. С этой целью тестировали ЕКР сибиреязвенного вирулентного штамма 81/1 и его производных штаммов, лишенных одной или обеих плазмид.

Результаты (Табл. 22) показывают снижение способности адсорбции октана и увеличение ЕКР соответственно. Штаммы, имеющие рХ02, обладают низким ЕКР и высокой способностью адсорбировать октан.

Когда клетки выращивали в CO_2 -богатой атмосфере в присутствии бикарбоната, их ЕКР увеличивался до 40 mv и они теряли любую способность прикрепляться к октану, доказывая гидрофильную природу таких культур. Имея высокий уровень ЕКР, вирулентный штамм 81/1 обладал высокой гидрофобностью, указывая на присутствие липких структур на поверхности клеток.

Споры вакцинного штамма СТИ-1 (рХ01⁺, рХ02⁻) имели заряд 18 mv. В течение первого часа инкубации при 37°C рост спор сопровождался увеличением ЕКР. Через 2 часа инкубации вся популяция состояла из вегетативных клеток; через 3 часа культивирования логарифмический рост бацилл сопровождался увеличением ЕКР до 25 mv.

Таблица 22.
Характеристика штаммов *Bac.anthraxis*

Штамм	ЕКР	Прикрепление к октану
81/1 (pX01 ⁺ , pX02 ⁺)	26,6±0,3	23,3%
81/1 (pX01 ⁺ , pX02 ⁻)	25,9±0,4	8,5%
81/1 (pX01 ⁻ , pX02 ⁺)	17,9±0,2	27,8%
81/1 (pX01 ⁻ , pX02 ⁻)	22,9±0,3	23,6%

Таким образом, экспрессия плазмид *Bac.anthraxis* влияет на структуру стенок клетки и процесс адгезии. Высокий заряд капсулы и гидрофильность подтверждают важность ее функционального значения в защите клеток *Bac.anthraxis* от фагоцитоза. С помощью измерения ЕКР можно легко обнаружить жизнеспособность спор *Bac.anthraxis*.

Для осуществления генетических исследований необходимо выделение ДНК *Bac.anthraxis*. Этому посвящены работы В.А.Гаврилова, Г.Ф.Архиповой и П.Ю.Зубаировой (1998), которые использовали метод Кассе в собственной модификации. С помощью этих методов удалось получить очищенные образцы плазмидной ДНК двух вакцинных штаммов: капсулообразующего штамма 71/12 и бескапсульного штамма 55-ВНИИВВиМ, причем оказалось, что штамм 71/12 содержит 2 плазмиды, а штамм 55-ВНИИВВиМ — одну.

Эти же авторы (1998) провели исследования по выделению и очистке хромосомной ДНК из клеток возбудителя сибирской язвы (55-ВНИИВВиМ, СТИ, 34-F-2) и аэробных спорообразующих бактерий — *Bac.cereus* и *Bac.subtilis*. Хромосомную ДНК выделяли ферментно-детергентным методом, а очистку проводили фенольным способом.

Большое значение в настоящее время придается типированию штаммов возбудителя сибирской язвы. Системы типирования делятся на фенотипические и генотипические. Последние основаны на анализе хромосомной ДНК и внехромосомных генетических элементов (Д.В.Колбасов, С.Ж.Цыбанов, 1998).

К классическим фенотипическим методам относят серотипирование, биотипирование, определение чувствительности к антибиотикам и фаготипирование.

117
СИБИРСКАЯ ЯЗВА
Генетические методы
а) анализ плазмид
б) рестрикционные
в) Southern-блоттинг
г) риботипирование
д) полимеразная
е) секвенирование
ПЦР считается на
нарушения и дифференци
мира.

Обстоятельные и
штаммов были проведены
Jones et al. [1998]. А
трализованной коллекции
ров затрудняет оп
Bac.anthraxis. Одна
этих проблем. Мног
лекции или изоляты
ках в репозитарий
верситете (США).
700, они являются
исключением Азии.

Успех в изучении
лять геномный анализ
лиморфизма длин
достигать очень бо
ков генома, содержа
al., 1997). Был та
(VrrA) для штаммо
al., 1997). В настоя
мосомных однок
формации из вари
помощью идентиф
идентифицированн
и pX02. Два плазм
наличия или отсут
кая комбинация из
кёров приблизите
шее отличительное
Генетический а
тификации больш

Генетические методы основаны на анализе ДНК и включают:

- а) анализ плазмидного профиля;
- б) рестрикционный анализ хромосомной ДНК;
- в) соузерн-блоттинг хромосомной ДНК;
- г) риботипирование;
- д) полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- е) секвенирование.

ПЦР считается наиболее информативной и достоверной для обнаружения и дифференциации различных представителей микромира.

Обстоятельные исследования по типированию сибиреязвенных штаммов были проведены М. Hugh-Jones, Р. Keim [1997], М. Hugh-Jones et al. [1998]. Авторы указывают, что отсутствие всеобщей централизованной коллекции штаммов и информативных ДНК маркеров затрудняет определение молекулярного разнообразия у *Bac. anthracis*. Однако имеется существенный прогресс в решении этих проблем. Многие исследователи подарили свои научные коллекции или изоляты, выделенные в местных (локальных) вспышках в репозиторий UN-WHO (ООН – ВОЗ) при Луизианском университете (США). Число штаммов, внесенных в реестр, превышает 700, они являются репрезентативными из всех регионов мира за исключением Азии.

Успех в изучении молекулярных маркеров позволяет осуществлять геномный анализ при использовании метода определения полиморфизма длины амплифицированного фрагмента (ПДАФ) и достигать очень большой степени в идентификации редких участков генома, содержащих отличительную информацию (Р. Keim et al., 1997). Был также обнаружен высоко информативный локус (*VrrA*) для штаммовых различий (Anderson et al., 1996; Jackson et al., 1997). В настоящее время обнаружено 7 дополнительных хромосомных однолокусовых маркеров с высоким содержанием информации из переменных ПДАФ маркеров. Это усиливается с помощью идентификации двух высоко информативных маркеров, идентифицированных из полных последовательностей плазмид *pX01* и *pX02*. Два плазмидных маркера обеспечивают простой скрининг наличия или отсутствия плазмид и плазмидное разнообразие. Такая комбинация из 10 высокоинформативных однолокусовых маркеров приблизительно из 30 ПДАФ маркеров обеспечивает большое отличительное множество для анализа штаммов *Bac. anthracis*.

Генетический анализ >500 штаммов *Bac. anthracis* привел к идентификации больших групповых отличий у этого патогена. Самые

выраженные отличия между набором южно-африканских штаммов (группа А) и всеми другими штаммами (группа В). Внутри группы В очевидных разделений не просматривается. Большинство добавленных кластеров наблюдали в группе А. Они включают группу, содержащую штаммы Sterne и Ames; группу, содержащую штаммы Vollum; и группу, установленную в Национальном парке Крюгера.

Изоляты из одной вспышки при этом анализе оказываются идентичными. Например, 42 пробы, выделенные в недавней австралийской вспышке, были также идентичными. Австралийский генотип оказался полностью соответствующим изоляту из Тамила (Индия). Занос этого штамма *Bac.anthraxis* с азиатского субконтинента при торговле в прошлом представляется вероятным.

Самый разнообразный характер штаммов отмечен в Южной Африке, где есть три больших группы – группа В, Sterne – Ames и Крюгер. Авторы считают, что это разнообразие обусловлено в данном регионе длительным существованием возбудителя сибирской язвы.

Dong Shulin (1998) дает рекомендации для типирования *Bac.anthraxis*:

1. Основа типирования. Типирование базируется на биологических характеристиках – инкапсулирование, продукция токсина, антигенные и иммуногенные свойства. Принимается во внимание также существование плазмид рХ01 и рХ02 и их генетические характеристики.

2. Стандарт типирования. Тип 1. Вирулентный штамм *Bac.anthraxis* (сар+, токс+), содержит плазмиды рХ01 и рХ02, патогенен для человека и животных.

Тип 2. Вакцинный штамм *Bac.anthraxis* (сар-, токс+), содержит плазмиды рХ01, но отсутствует плазида рХ02, используется для производства вакцин.

Тип 3. Авирулентный штамм *Bac.anthraxis* (сар+, токс-), содержит плазмиду рХ02, но отсутствует плазида рХ01. Обладает патогенностью и летальностью для экспериментальных животных.

Тип 4. Невирулентный штамм *Bac.anthraxis* (сар-, токс-). Отсутствуют обе плазмиды рХ01 и рХ02. Непатогенен.

3. Идентификация типизируемого штамма. В твердую и жидкую среду, содержащую 0,9% NaHCO_3 , добавляли 50% сыворотки крови животных (овец или кроликов), инкубировали в атмосфере CO_2 (10-12%) при 37°C в течение 24 часов.

Появляются колонии М-формы, под микроскопом видны вегетативные клетки с капсулами. Культуральные фильтраты могут ин-

Тип	Ш
1	Вирул
2	Вакци
3	Авиру
4	Непат

Л.Я.Ци
бор препара
методом П
цилл в пр
Н.М.Гриш

119
дуцировать с
ной инъекции
токсина. В
рХ01 (83 кД
В указан
ются колонии
туральных ф
стствует тольк
В тех же
мы. Вегетат
В зоне ДНК
тип 3-й.
В переч
колонии S-ф
вегетативны
рХ02. Это т
4. Выво
гическим и
представле
чально на в
назвать как

дуцировать отеки у кроликов и морских свинок при интрадермальной инъекции. Появляется реакция преципитации в геле против токсина. В электрофорезе обнаруживаются 2 линии в зоне ДНК рХ01 (83 кДа) и рХ02 (60 кДа). **Это тип 1-й.**

В указанных выше условиях среды и культивирования появляются колонии R-формы. Вегетативные клетки без капсул. В культуральных фильтратах обнаруживают токсин. В зоне ДНК присутствует только плазида рХ01 (83 кДа). **Это тип 2-й.**

В тех же условиях выращивания появляются колонии M-формы. Вегетативные клетки с капсулой, но токсин не продуцируется. В зоне ДНК обнаруживается только плазида рХ02 (60 кДа). **Это тип 3-й.**

В перечисленных выше условиях культивирования появляются колонии S-формы, отсутствует капсула и не продуцируется токсин вегетативными клетками. Не обнаруживаются плазмиды рХ01 и рХ02. **Это тип 4-й.**

4. *Вывод.* Согласно биологическим, иммунологическим, серологическим и генетическим характеристикам *Bac.anthraxis* может быть представлен 4 типами – 1, 2, 3 и 4. Типирование основано первоначально на выявлении плазмид, поэтому эту классификацию можно назвать как типирование плазмидных мутантов.

Таблица 23.
Рекомендации по типированию *Bac.anthraxis*
(Dong Shulin, 1998)

Тип	Штамм	Наличие						
		капсула	токсин	плазида		патогенность		колонии форма
				рХ01	рХ02	человек	животное	
1	Вирулентный	+	+	+	+	+	+	M
2	Вакцинный	-	+	+	-	-	-	R
3	Авирулентный	+	-	-	+	-	+	M
4	Непатогенный	-	-	-	-	-	-	S

Л.Я.Цыбанова, Ю.О.Селянинов и др. (1998) разработали набор препаратов для выявления ДНК возбудителя сибирской язвы методом ПЦР, который позволяет определять до 1-10 клеток бактерий в пробе. Аналогичные данные приведены и в публикации Н.М.Гришкевич и Т.Х.Фаизова (1998).

Большое значение придается изучению сибиреязвенных бактериофагов. С их помощью проводятся молекулярно-генетические исследования. Фаги находят широкое применение в лабораторной диагностике сибирской язвы.

Во ВНИИВВиМ был предложен сибиреязвенный бактериофаг, обладающий широким спектром литической активности и более высокой специфичностью, чем ранее применявшиеся в стране фаги К-ВИЭВ и гамма-МВА (И.А.Бакулов, В.А.Гаврилов, В.С.Русалеев, В.М.Котляров, Л.Ф.Николайчук, Ю.В.Числов, 1986).

Предложенный «Fah – ВНИИВВиМ» лизировал не менее 98% исследованных сибиреязвенных штаммов и не взаимодействовал с другими видами бацилл. Он рекомендован для индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы. «Fah – ВНИИВВиМ» представляет собой фаголизат индикаторного вакцинного штамма «Шуя-15» в полусинтетической пептонно-дрожжевой жидкой среде.

О проведенных исследованиях с использованием сибиреязвенных фагов сообщили С.Redmond et al. (1996). Были изучены 87 штаммов *Bac.anthraxis*, 9 – *Bac.cereus* и 41 штамм бацилл других видов. Авторы указывают, что большинство (85%) штаммов *Bac.anthraxis* лизировались всеми фагами и почти все (90%) других видов бацилл не реагировали. Несколько штаммов давали изменчивые результаты, что, по мнению авторов, можно отнести за счет фенотипических различий между фагами. Под электронным микроскопом установлена морфологическая идентичность фагов.

Таковы основные результаты исследований по изучению свойств *Bac.anthraxis*, проведенных в 1980-1999 гг. Они подчеркивают интерес исследователей к познанию молекулярно-генетических особенностей этого микроорганизма и расширяют возможности создания и применения новых диагностических и защитных средств.

4. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ И ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ

Клинические признаки, формы и характер течения болезни при сибирской язве (антраксе) сельскохозяйственных (домашних) животных подробно описаны в учебниках, руководствах по инфекционной патологии. В доступной нам современной литературе мы не нашли каких-либо новых сведений по этим вопросам. Можно дополнить лишь описаниями клинической картины и патологоанатомических изменений при сибирской язве у диких животных.

Интересное сообщение представлено J.Cooper, I.Matovelo, A.Baskerville (1996), которые наблюдали вспышку антракса у африканских диких гиеновых собак (*Lycaon pictus*) в заповеднике Selon Game Reserve в Танзании, как уже было указано. В трех сворах у 17% взрослых и 33% щенков наблюдали признаки болезни. 4 (17%) из 24 щенков погибли. В других сворах собак болезнь не обнаруживали.

У погибших щенков отмечены геморрагические истечения из носовой полости, подкожные гематомы в области морды, под нижней челюстью и в грудной полости. В полостях тела — частично свернувшаяся кровь. Селезенка набухшая, наполнена кровью. Легкие также наполнены кровью и отечны. Поверхностные лимфоузлы увеличены. В тонком отделе кишечника наличие воспалительных процессов.

У одного щенка обнаружены язвы на коже, некротические поражения десен, застойные явления в желчном пузыре, гиперемия слизистой оболочки желудка.

Диагноз на антракс подтвержден лабораторными исследованиями.

По данным N.Kriek, V.de Vos (1996), существуют видовые различия в патологии антракса у диких животных в Национальном парке Крюгера (Южная Африка). Не менее 36 видов диких животных болеют и погибают от этой болезни. Несмотря на большое число погибших (до 1500 голов за каждый из двух последних лет), оказалось мало трупов, пригодных для исследования. Это обусловлено громадными размерами заповедников, наличием животных-падальщиков (питающихся падалью) и быстрым разложением трупов под влиянием высокой температуры воздуха (40°C и более).

На основании данных вскрытия установлены следующие патологоанатомические изменения:

1. Тяжелая, сверхострая септицемия без локализации в определенных органах у антилоп – импала (*Aepyceros melampus*) с явлениями застоя крови, цианоза, неполного свертывания крови, отсутствия изменений селезенки. При гистологическом исследовании обнаружен сильный отек головного мозга.

2. Типичная геморрагическая септицемия отмечена у куду, импала, водяного оленя (*Waterbuck*) и лошадиной антилопы (*Hippotragus equinus*). У этих животных обнаружены застойные явления, множественные петехиальные кровоизлияния под кожей и в слизистых оболочках, цианоз, слабо выраженное свертывание крови, резко выраженная спленомегалия (увеличение селезенки) и диффузный фибринозно-геморрагический энтерит у куду.

3. Геморрагическая септицемия и переменная органная локализация при естественном заболевании антраксом у африканского буйвола. На вскрытии поражения варьировались от незначительных изменений в виде застоя крови и цианоза до таких, при которых устанавливали отчетливую спленомегалию, отек легких, некротический лимфаденит, сегментальный, некротический энтерит.

4. Локальные поражения с отсутствием септицемии или с признаками поздней септицемии у африканского льва. Поражения различной тяжести обычно локализовались на морде, в ротовой полости и региональных лимфоузлах. Обнаруживали некротический глоссит (поражение языка) или стоматит, обширный некротический целлюлит (поражения клеток эпителия) на губах и морде, сопровождаемый выраженным отеком. Поражений, характерных для септицемии, при вскрытии не обнаруживали.

Как уже было указано, у лесных бизонов в Канаде эпизоотия антракса, которая началась еще в 1963 году, проявляется своеобразно, что наталкивает на мысль о возможности латентного течения инфекции (M. Hugh-Jones, 1996).

Во многих литературных источниках, опубликованных в последние годы, приводятся данные о характере проявления сибирской язвы у людей. Известно, что сибирская язва у людей протекает в кожной, кишечной и респираторной формах.

В современных условиях наиболее часто встречается кожная форма (сообщения из Турции, Великобритании, Швейцарии, Индии, Индонезии, Зимбабве и др.), реже диагностируется кишечная форма (Турция, Южная Корея, Индия, Индонезия, Зимбабве) и совсем редко – респираторная или ингаляционная форма (Непал, Швейцария).

А. Amaraoni, K. Tabarra, K. Zaghoul (1992) описали 3 случая заболеваний глаз, выразившихся в образовании зудящих эритематозных папул на краях век, позднее превращавшихся в некротические язвы, покрытые черным налетом. При микроскопии материала с поверхности язв и биоптатов выявлено наличие грамположительных бацилл, при посеве идентифицированных как *Bac. anthracis*. Терапия пенициллином внутривенно привела к излечению.

Чаще сибирская язва обнаруживается у мужчин, причем преобладают сельскохозяйственные рабочие, фермеры, а также мясники, встречаются и ветеринарные работники, рабочие текстильных предприятий.

Из клинических проявлений отмечены поражения верхних дыхательных путей (глотки, гортани), высокая температура тела, лимфаденопатия, токсемия, септицемия, менингиты и менингоэнцефалиты, кишечные расстройства (рвота, диарея и т.п.), кожные поражения в виде язв с некротическим распадом тканей и ярко выраженным ободком вокруг самой язвы с последующим образованием струпов, отеки, иногда массивные.

Болезнь сопровождается сильными головными болями, болями в горле, груди, в абдоминальной области (симптомы «острого живота»), кашлем (при респираторной форме).

Авторам этой книги хотелось показать на ярком примере насколько коварна и беспощадна сибирская язва, какие тяжелые последствия происходят, если правильный диагноз ставится с запозданием, а меры принимаются не оперативно и не квалифицированно, сколь многообразны пути распространения возбудителя этой болезни.

Для иллюстрации вышенаписанного мы использовали статью «Юлсубинская трагедия» из журнала «Ветеринарный врач», Казань, № 1, 2000 г. (печатается с небольшими сокращениями). Ее автор Ахметов Р.М. – кандидат ветеринарных наук, заслуженный ветеринарный врач Республики Татарстан.

«Шел июль 1953 года. В семье колхозного агротехника Гиззата Валиева, жителя деревни Юлсубино Кзыл-Юлдузского района (ныне входит в состав Рыбнослободского) Татарстана, умер 10-летний сын Габдулла. Заключение анатома судебной экспертизы – смерть наступила в результате крупозного воспаления легких. Это и стало точкой отсчета юлсупинской трагедии.

Ровно через месяц в той же семье заболела приемная дочь Флора. Болезнь развивалась бурно, сопровождалась рвотой, поносом. Через 13 дней Флора умерла. Сельская фельдшерица написала в справке: причина смерти – гастроэнтероколит.

За день до кончины Флоры занемогла родственница Валиевых — Замиля, часто посещавшая их дом. У нее появилась резкая слабость, сильная одышка. Диагноз райбольницы — пневмония. Через 5 дней Замиля умерла. И в тот же день в семье Валиевых заболел 6-летний Наиль.

Казалось бы, уж тут-то надо было поднять тревогу! Но... Заболевание протекало при сильных головных и желудочных болях. Через день мальчика не стало. Фельдшерица написала: острый гастрит.

Зловещая спираль продолжала раскручиваться. Заболевает двухлетний Ибрагим из семьи умершей Замили Гарифуллиной. Мальчик часто вместе со старшей сестрой бывал в доме Валиевых. Вот и у него понос, рвота. А когда малыш скончался, у местной фельдшерицы уже был готовый диагноз: гастроэнтероколит.

Через 10 дней у Валиевых свалился 7-летний Равиль. На следующий день и его не стало. Заключение районного анатома: «воспаление легких, гнойный менингит, двусторонний гнойный отит, аскаридоз». Мало того, что в заключении не было самого главного, вскрытый труп мальчика без достаточных предосторожностей был отдан отцу, отвезен им домой и по обычаю обмыт и погребен.

Будто злой рок витал над несчастным семейством. Заболела двухлетняя Нурзия — последний ребенок в семье. Припадки, угнетение, сильная жажда, понос... Девочка умерла в течение суток. На этот раз фельдшерица написала — от воспаления легких. Следом заболевают и умирают две родственницы, ухаживавшие за больными. Диагноз фельдшерицы был так же далек от истины, как и во всех предыдущих случаях.

Наконец, свалился сам глава семьи Гиззат Валиев. И, так уж угодно было судьбе, только на этот раз был поставлен правильный диагноз: сибирская язва. Патологоанатомическое вскрытие было произведено доцентом мединститута Лаптевой. Она и заподозрила это редкое, но страшное заболевание.

Как у нас водится, почти на каждом шагу этой трагической истории допускались небрежности, последствия которых продолжались еще некоторое время. Например, труп Гиззата Валиева перевозили двое односельчан, не сознававших опасности, обмывали труп во дворе дома хозяина. Сколько людей в деревне было инфицировано, этого не мог сказать никто.

Наконец тревога была поднята. Министерство здравоохранения республики направило в деревню комиссию, в состав которой входили два профессора, кандидаты наук, зам.министра. Входили в

125
нее и два в
строк. Про
дования. Во
бы взять м
делали все
В пер
Валиева и
для госпит
ной больни
рипова. Вс
Для пр
тивоэпизо
циалистов
конкретно
Среди жи
течение по
венные пр
новодческ
нии, выяв
Межд
довольно
произошел
удалось. Д
начиная с
век: шест
фуллиной
смертност
специфич
Из се
Казани в
вскоре до
года оста
На следу
и засыпа
тии труп
Поте
ву, чтоб
дановой
хоть бы
тка — Ша
ринарно
часть оди

нее и два ветеринарных специалиста, одним из них был автор этих строк. Провели эпидемиологическое и эпизоотологическое обследования. Вскрыли могилу первого умершего в семье Валиевых, чтобы взять материал для исследования на сибирскую язву. Словом, делали все, что полагается в таких случаях.

В период пребывания комиссии в Юлсубино заболели жена Валиева и Каусар Гарипова. Их немедленно отправили в Казань для госпитализации и уточнения диагноза. Однако и в инфекционной больнице города цепочка смертей продолжалась — умерла К. Гарипова. Все исследования указывали на сибирскую язву.

Для практического проведения противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий в деревню прибыл дезотряд специалистов. Изучение эпизоотической ситуации не дало какого-либо конкретного результата по выявлению первоисточника заражения. Среди животных случаев заболевания сибирской язвой не было в течение последних 5 лет. Ежегодно проводились противосибиреязвенные прививки. Каких-либо контактов семьи Валиевых с животноводческими продуктами, подозрительными в санитарном отношении, выявлено не было.

Между тем, 24 октября заболела, а 26 умерла Г. Сафина. Она довольно часто контактировала с семьей Валиевых. Этот случай произошел на глазах опытных специалистов, но спасти человека не удалось. Диагноз был неумолим: сибирская язва. Таким образом, начиная с июля и по октябрь в деревне Юлсубино умерли 12 человек: шестеро — в семье Г. Валиева, трое — в семье его сестры Гарифуллиной и трое — в различных других семьях. Такая высокая смертность явилась следствием ошибочных диагнозов и отсутствия специфического лечения.

Из семьи Валиевых в живых осталась только хозяйка — ее в Казани вылечили. Казалось, цепь несчастий на этом оборвалась. Но вскоре допущенные ошибки снова стали мстить. В октябре 1953 года оставшаяся одинокой хозяйка вернулась в пустовавший дом. На следующий год она засеяла огород, осенью выкопала картошку и засыпала ее в подполье. А ведь туда стекла жидкость при вскрытии трупа.

Потеряв всю семью, Валиева пригласила к себе Шагимарданову, чтобы вдвоем коротать зимнее время. Уже в декабре Шагимардановой не стало: кратковременная болезнь, трагический конец. Ну, хоть бы на этом все остановилось! Нет, появилась новая квартирантка — Шавалиева. 26 февраля не стало и ее. Республиканская ветеринарно-бактериологическая лаборатория в обоих случаях заключает однозначно: сибирская язва.

В мае 1954 года Валиева переезжает в дом Фатыхова. Перед этим в специальной камере обрабатываются вся ее одежда, постельные принадлежности. Во двор Фатыхова переведен и принадлежавший Валиевой скот.

Некоторое время – с февраля по май 1954 года – деревня Юлсубино перестает привлекать к себе внимание медицинского надзора. Но вот 6 мая внезапно умирает трехлетняя дочь Фатыхова. Опять сибирская язва!

13 мая на подворье Фатыхова пал ягненок. Лабораторный анализ указал на то же заболевание. Наконец, в том же месяце и от той же болезни помирает второй ребенок Фатыхова.

Когда стали снова во всем разбираться, выяснилось следующее. С переходом Валиевой к Фатыхову ее дом после дезинфекции был закрыт. Картофель оставался в подполье. Но, как рассказал Фатыхов, Валиева вынесла через окно два мешка клубней. Картофель варила, а очистки давала животным. Это, вероятно, и был путь заноса инфекции в дом Фатыхова.

Тщательное изучение подтверждало версию: первоисточником заболевания (заражение мальчика Габдуллы) была почва. Но дальнейшее распространение инфекции шло своеобразным «юлсубинским» путем. Основным эпизоотическим очагом стал дом Валиевых и они сами. Выделения больных, содержащие в огромных количествах споры сибирской язвы, массивное заражение одежды, утвари, посуды, земли, возможность вегетации и размножения спор сибирской язвы в подполье, в сырых углах избы, в посуде с остатками пищи и создали опаснейший очаг заражения.

Высокой смертности способствовали отсутствие госпитализации, необходимых лабораторных исследований, нарушение всех правил предосторожности, элементарная санитарная безграмотность взрослых жертв трагедии. Случаи заболевания людей в 1954 году находились в тесной связи с эпидемией 1953 года, имели общий источник возбудителя инфекции. Обстоятельства гибели людей от сибирской язвы в деревне Юлсубино указывают со всей определенностью на ее эндемический характер со своеобразными условиями заражения.

... В один из безветренных июльских дней злополучный дом Валиева, под крышей которого разыгралась подлинная трагедия, был предан огню. Дом сгорел дотла, а верхний слой земли подворья, огорода, близлежащей территории был срезан ножом бульдозера. Он и поныне напоминает людям об опасности, притаившейся здесь. Она еще может постучаться в дома, вторгнуться в человеческие судьбы, если потерять бдительность».

127
Описано
(1998) о то
«сентинел
страж) –
держиваю
такта с пер
чески на
лов и соав
тел у люд
лезни у ж
скота) не

Считаю
шему мне
тов. Обно
антраксу

По дан
ской язвы
1950 гг.)

леблясь в
отмечен с

зайка – в
при этом
заметила

вилась в
Э.Н.И.
D.Salmo

наблюда
никшую
чистки л

Во вр
в 9 случа
лял от 2

По да
до 5 дне
Друг

от 2 до 5
ный пер
(1960) п

И.А.Д
ке у пац
были при

Описанный случай согласуется с сообщением М. Hugh-Jones (1998) о том, что во многих странах люди, по существу, играют роль «сентинелей». Напомним, что сентинели (англ. sentinel – часовой, страж) – подсадные животные, которых определенное время выдерживают в подозреваемой по неблагополучию местности для контакта с переносчиками и дикими животными и исследуют периодически на наличие возбудителей болезней или антител (И.А. Бакулов и соавт., 1986). Появление признаков сибирской язвы или антител у людей чаще всего является следствием ранее возникшей болезни у животных, большинство из которых (случаев болезни у скота) не регистрируется.

Считаем необходимым процитировать некоторые работы, по нашему мнению, недостаточно известные широкому кругу специалистов. Обзор сделан по материалам Международного симпозиума по антраксу (Salisbury Med. Bul., 1996).

По данным Э.Н. Шляхова, у пациентов с кожной формой сибирской язвы (1215 случаев, зарегистрированных в Молдавии в 1946-1950 гг.) инкубационный период в среднем составлял 2-3 дня, колеблясь в пределах от 9 часов до 10 дней. Пациентка, у которой отмечен самый короткий инкубационный период, – домашняя хозяйка – выколачивала пыль из старой овечьей шубы в 10 часов утра, при этом клочки шерсти попадали на ее лицо. Около 19 часов она заметила на подбородке зудящую папулу, которая впоследствии развилась в типичный сибиреязвенный карбункул.

Э.Н. Шляхов ссылается также на случай, описанный в 1896 году D. Salmon, известным исследователем сальмонелл, который лично наблюдал сибиреязвенную пустулу на суставе пальца конюха, возникшую через 12 часов после использования им новой щетки для чистки лошадей.

Во время эпидемии, описанной в Швейцарии (R. Pfisterer, 1991), в 9 случаях кожной формы антракса инкубационный период составлял от 2,5 до 5 дней, в большинстве случаев 3-4 дня.

По данным M. Doganу, инкубационный период продолжался от 3 до 5 дней в среднем, изменяясь от 2 до 12 дней.

Другие сообщения: Vouquien (1950) – инкубационный период от 2 до 5 дней; Gold (1955) – сообщено о 117 случаях, инкубационный период длился от 12 часов до 5 дней, в среднем 3 дня; Brachman (1960) пишет о его продолжительности от 1 до 8 дней.

И.А. Дмитриев (1929) описал вспышку сибирской язвы в Курске у пациентов, привитых антирабической вакциной. 65 пациентов были привиты одним шприцем, который предварительно использо-

вали для диспергирования спор антракса. У 30 из них возникла кожная форма сибирской язвы с инкубационным периодом 1 день (1 пациент), 3 дня (2 пациента), 4 дня (2 пациента), 5 дней (2 пациента), 6 дней (10 пациентов), 7 дней (5 пациентов), 9 дней (1 пациент), 12 дней (1 пациент).

Э.Н.Шляхов наблюдал 3 случая повторного заболевания кожной формой сибирской язвы спустя 8, 15 и 20 лет после первой атаки. Двое пациентов были ветеринарными специалистами, у одного из них карбункул локализовался на том же месте руки, что и 15 лет тому назад.

Реинфекцию кожной формы антракса нередко описывал в Эфиопии Martin (1975), при этом вторичная инфекция протекала менее тяжело, чем первичная.

Hodgson (1941) наблюдал у одного ветеринарного специалиста повторную инфекцию трижды.

В Британии за 13-летний период (1899-1912) до применения антибиотиков и вакцин описано 315 случаев кожного антракса, 40 из них (12,5%) закончились летально.

Э.Н.Шляхов сообщает: из 622 пациентов, у которых поражения были локализованы на голове и лице, 52 умерли; из 181 больного с поражениями на шее и боковой стороне головы умерли 14; из 34 пациентов с поражениями на нижних конечностях умер один. 17 пациентов, у которых поражения наблюдали на туловище, выжили. Большинство летальных исходов ($> 50\%$) было у пациентов, у которых поражения локализовались на веках и подбородке.

Для диагно
тих десятилет
биологии: мик
культурально-с
животных и се
эти методы в д
Но, как уже б
нии Р.Титнб
сибирскую яз
обеспечивали

В настоя
ределенные т
сты разучил
эволюцией

Широко
ванных и ж
тенции вак
окружающе
ствами, ци

Примен
шая группа
по основн
другим сво
«антракоид
временной
вероятно, и
ства. При
ным, что р
ных видов
щих более
свинок. Н
генен для
возникает
Как изв
ся на эпизо
териологич
5-983

5. НОВЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА) И ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БОЛЕЗНИ

Для диагностики сибирской язвы животных на протяжении многих десятилетий успешно применяли методы классической микробиологии: микроскопию мазков, идентификацию возбудителя по культурально-биохимическим свойствам, биопробы на лабораторных животных и серологические реакции (Асколи). Длительное время эти методы в достаточной степени удовлетворяли науку и практику. Но, как уже было сказано выше, известный ученый из Великобритании Р. Turnbull посетовал, что раньше у специалистов диагноз на сибирскую язву сомнений не вызывал, существовавшие критерии обеспечивали бесспорные результаты.

В настоящее время в диагностике сибирской язвы возникли определенные трудности. Это не означает вовсе, что теперь специалисты разучились ставить диагноз. Затруднения возникли в связи с эволюцией микроорганизмов.

Широкое применение в ветеринарии антибиотиков, инаktivированных и живых вакцин привело к реверсии и длительной персистенции вакцинных штаммов в организме животных, загрязнению окружающей среды живыми микроорганизмами с измененными свойствами, циркуляции атипичных штаммов.

Применительно к возбудителю сибирской язвы обнаружена большая группа микробов-сапрофитов, близкородственных *Bac. anthracis* по основным культурально-морфологическим, биохимическим и другим свойствам. Эту группу практические специалисты называли «антракоиды или группа псевдоантракса», хотя такое понятие в современной классификации бактерий отсутствует. Его применение, вероятно, имеет право на употребление лишь с точки зрения удобства. При употреблении термина «антракоиды» становится понятным, что речь идет о группе полевых бескапсульных штаммов разных видов бацилл, широко распространенных в природе, обладающих более низкой вирулентностью для белых мышей и морских свинок. Наиболее близкий к *Bac. anthracis* — *Bac. cereus* даже патогенен для мышей и человека. Именно с этим микробом более всего возникает трудностей при дифференциации.

Как известно, постановка диагноза на сибирскую язву базируется на эпизоотологических, клинических данных и результатах бактериологического исследования. Вскрытие недопустимо, а методы

прижизненной диагностики (серологические и аллергические) пока не вошли в практику, отчасти и из-за скоротечной гибели животных.

Техника постановки лабораторного диагноза описана в «Методических указаниях по лабораторной диагностике сибирской язвы у людей и животных, обнаружению возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды» (1989 г.).

Взятие материала от вынужденно убитых животных и его исследование проводят в соответствии с ГОСТом 212375 «Мясо. Методы бактериологического анализа» и действующими «Правилами ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов».

Антраксин-кожный тест. Для ранней и ретроспективной диагностики антракса человека был разработан иммунологический метод с использованием антраксина, антраксин-кожный тест (АКТ). Он применялся также для оценки вакцин, включая способ вакцинации и эффективную дозу. Для использования в медицинской практике АКТ был разрешен для применения в СССР с 1962 года. Значительные исследования по этому вопросу провел Э.Н.Шляхов в Молдавии.

Антраксин — антигенный препарат, выделенный из бескапсульных штаммов *Bac.anthraxis*. Внутрикожное введение его вызывает аллергическую реакцию через 18-24 часа в виде местного покраснения и отека кожи у больных с острой формой антракса или у выздоровевших пациентов. Реакция проявляется также у вакцинированных людей и животных (морские свинки).

Реакцию ставят на внутренней поверхности верхней трети предплечья: 0,1 мл антраксина вводят шприцем с тонкой иглой строго внутрикожно с соблюдением правил асептики. В кожу другого предплечья (в качестве контроля) вторым шприцем с тонкой иглой инъецируют такое же количество стерильного 0,9-процентного физиологического раствора. Реакцию учитывают через 24 и 48 часов в соответствии с наставлением по применению препарата.

Гистологическое и иммунологическое изучение кожной реакции определяет ее как реакцию гиперчувствительности замедленного типа, которая отражает наличие клеточного иммунитета к антраксу.

Проанализируем возможности метода. При постановке диагноза кожного антракса для исключения ошибок (с чем сталкиваются в настоящее время в 98-99% случаев) необходимо провести обязательное бактериологическое подтверждение (Е.Шляхов, 1996). Однако выделить возбудитель удастся не всегда.

131
В течение по-
нарастающее от-
участка кожи, в
микрофлорой и
тернологически
делить возбудит-
когда сформиро-
позднее появле-
дней спустя пос-
рологических м-
Е.Shlyakhov
тов АКТ и выд-
рой формой (9-
был положитель-
ру удалось выд-
АКТ выявлял
дни: 4-7 дней по-
278 (89,5%), в
- у 332 из 354
соответственно
тов, в то же в-
(97,3%) пациен-
Спустя месяц
таты бактериол-
цательными.
У этих же п-
тельные: от 29
из 363 (92,8%)
года у 48 из 66
Возраст и п-
время раннее п-
мицином сниж-
поражений на
рук процент
(Е.Shlyakhov,
Изучено р-
большой груп-
способами: ск-
валась у 28,1%
затем процент
ставлял 30%.

В течение первых дней после начала заболевания происходит нарастающее отмирание бактерий, находящихся внутри пораженного участка кожи, в результате антагонизма с локальной убикваторной микрофлорой и раннего применения антибиотиков. Поэтому «бактериологически положительная стадия», т.е. время, когда можно выделить возбудитель, составляет очень короткий период – обычно, когда сформировался струп, это сделать уже не удастся. Кроме того, позднее появление специфических антител, по крайней мере 10-15 дней спустя после начала заболевания, означает непригодность серологических методов (например, ELISA) для ранней диагностики.

Е. Shlyakhov (1996) провел сравнительное изучение результатов АКТ и выделения культуры у одних и тех же пациентов с острой формой (984 человека). У 90 из 110 (81,8%) испытуемых АКТ был положительным в первые 3 дня болезни, в то время как культуру удалось выделить у 78 из 187 (41,7%) положительных по АКТ. АКТ выявлял больше положительных случаев и в последующие дни: 4-7 дней после заболевания АКТ был положительный у 249 из 278 (89,5%), выделение культуры у 222 (32%) пациентов; 8-14 дней – у 332 из 354 (93,8%) и только у 23 из 127 (18,4%) пациентов соответственно. Через 28 дней культуру не выделили у 14 пациентов, в то же время положительный АКТ обнаружили у 72 из 74 (97,3%) пациентов.

Спустя месяц после начала заболевания острой формой результаты бактериологического обследования 950 пациентов были отрицательными.

У этих же пациентов результаты антраксин-теста были положительными: от 29-44 дня у 65 из 66 (98,5%), от 45 дней до 3 лет у 337 из 363 (92,8%), от 4-х до 15 лет у 373 из 455 (82,8%), от 16 лет до 31 года у 48 из 66 (72,7%) обследованных.

Возраст и пол пациентов влияния на тест не оказывали, в то же время раннее применение пенициллина в комбинации со стрептомицином снижало показатели на 4-5%. При локализации кожных поражений на щеке, подбородке, на передней стороне шеи, пальцах рук процент положительных случаев увеличивался на 5-7% (Е. Shlyakhov, Е. Rubinstein, 1993).

Изучено развитие кожной реакции на введение антраксина у большой группы лиц, вакцинированных вакциной СТИ разными способами: скарификацией кожи, подкожным введением и аэрогенным путем (2509 человек). Положительная кожная реакция развивалась у 28,1% испытуемых со 2-го по 5-й день после вакцинации, затем процент таких лиц повышался до 61,3% и в конце года составлял 30%.

Положительный АКТ развивался во всех группах вакцинированных, не зависел от пути и дозы введения вакцины. Можно было выделить 5 фаз кривой, описывающей его развитие. В 1-й латентной фазе со 2 по 5 дни после вакцинации наблюдали относительно небольшое число положительных реакций, в среднем 28,1%. Во 2-й экспоненциальной фазе на 15 день их было в среднем 61,3%. В 3-й фазе на 30 день регистрировали снижение антраксположительных реакций до 40,2%. К 90 дню (4-я фаза) этот показатель вновь восстанавливался до 53,1%. После этого продолжал снижаться и в конце года составил 30%.

Временное снижение числа реагирующих к 30 дню после вакцинации, возможно, вызвано истощением макрофагов, взаимодействующих с летальным токсином, образующимся при размножении бактерий.

Действие антраксина изучено в опытах на морских свинках (Е. Shlyakhov, 1996). Вакциной СТИ вакцинировали 5 групп морских свинок (6-10 особей в группе) подкожно в паховую область в дозе 4×10^7 спор. Через 2, 5, 7, 15 и 20 дней после вакцинации на животных нескольких групп провели испытание антраксина. В эти же дни отбирали пробы внутренних органов и крови для бактериологического анализа. Вакцинный штамм выделили на 2 день из регионального лимфоузла, селезенки, легких; на 5 и 7 дни — из регионального лимфоузла и селезенки; на 15 день — только из регионального лимфоузла, на 20 день вакцинный штамм больше не выделяли.

Изучая действие антраксина, автор установил наличие положительных реакций у одной из 6 (16,6%) на 2 день и у 9 из 10 морских свинок (90%) на 20 день после вакцинации. Он полагает, что клеточный иммунитет, ответственный за экспрессию антраксин-кожной реакции, вызывает элиминацию вакцинного штамма СТИ из тканей иммунизированных морских свинок.

Автор считает, что АКТ в 7-17 раз более чувствителен, чем метод выделения культуры, и может быть использован как альтернативный метод в случаях, когда не удастся подтвердить антракс у человека ни бактериологически, ни серологически. По его мнению, метод может быть также полезным при сравнительном испытании живой антраксвакцины и изучении поствакцинального иммунитета у людей и животных.

Мы полагаем, что в данном случае это утверждение относится только к морским свинкам, полученные результаты без экспериментальной проверки не распространяются на другие виды животных, особенно сельскохозяйственных.

Для установления диагноза на сибирскую язву сельскохозяйственных животных ВНИИВВиМ предложил сибиреязвенный аллерген (А.Е.Лавресюк и др., 1988; И.А.Бакулов, В.В.Селиверстов, В.А.Ведерников, В.А.Гаврилов, 1996). Он предназначался прежде всего для постановки прижизненного диагноза на сибирскую язву у свиней в связи со сложностью его постановки у этого вида, так как признаки болезни часто могут отсутствовать. Этот же аллерген может быть использован для прижизненной диагностики и оценки иммунитета у привитых против сибирской язвы лошадей, крупного и мелкого рогатого скота.

Сибиреязвенный аллерген ВНИИВВиМ представляет собой стерильный лиофилизированный препарат цитоплазматической фракции вакцинного сибиреязвенного штамма. Его вводят в дозе 0,2 мл внутрикожно: свиньям в среднюю часть наружной поверхности уха, крупному и мелкому рогатому скоту — в область подхвостового зеркала или промежности, лошадям — в среднюю треть шеи.

Реакцию у свиней учитывают через 5-6 часов и считают положительной при наличии гиперемии и инфильтрата диаметром 10 мм и более в месте введения аллергена, при наличии утолщения кожной складки на 3 мм и более. Такое животное признают больным и изолируют. Если у животного регистрируют сомнительную реакцию, аллерген вводят повторно через 24 часа. Если после повторного введения аллергена у животного регистрируют положительную или сомнительную реакцию, его признают больным и изолируют.

Оценку реакции у лошадей, крупного и мелкого рогатого скота проводят через 20-24 часа. Реакция считается положительной и свидетельствует о наличии иммунитета у вакцинированного животного, если на месте введения аллергена обнаружен инфильтрат при утолщении кожной складки на 3-10 мм. Гиперэргическая реакция (обширный болезненный отек, утолщение кожной складки более чем на 10 мм) дает основание подозревать заражение сибирской язвой. В этом случае животных изолируют, проводят дополнительное обследование и лечат в соответствии с действующей инструкцией.

Для идентификации возбудителя сибирской язвы широко применяют методы, выявляющие фенотипические различия штамма, в том числе определение характера роста на различных питательных средах, чувствительность к пенициллину и гамма-фагу, образование капсул, взаимосвязь со специфическими лектинами, проба на ферментацию углеводов, профили жирных кислот, тест на образование сибиреязвенного токсина, биопроба на лабораторных животных и др.

В настоящее время эти методы не полностью удовлетворяют практике из-за способности бацилл изменять оцениваемые характеристики, что выражается в неоднозначности получаемых результатов при установлении видовой принадлежности. Кроме того, они требуют много времени и средств.

В последние годы существенный прогресс в сфере диагностики инфекционных болезней был достигнут благодаря современным успехам молекулярной биологии, иммунологии, биотехнологии, генетики. Особенно бурно развиваются исследования по созданию диагностических средств и методов на основе анализа нуклеиновых кислот, определяющих индивидуальность любого организма (генотипические методы).

Эти методы, хотя и являются относительно трудоемкими и требуют высокой квалификации исследователя, наиболее чувствительны, позволяют обнаруживать с высокой точностью даже единичный геном возбудителя, независимо от его антигенной и фенотипической изменчивости.

Среди достаточно широкого набора молекулярно-биологических методик большее внимание привлекают рестрикционный анализ, молекулярная гибридизация, геномная дактилоскопия, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Следует, однако, четко отметить: на современном этапе применение генотипических методов пока не исключает классических, а может лишь дополнять их для быстрой и точной постановки диагноза.

Пока генотипические методы не могут получить широкого применения в практической ветеринарной деятельности России и стран СНГ по целому ряду причин. Отсутствие в ветеринарных лабораториях необходимого оборудования, обученных кадров, средств, определенный консерватизм мышления, традиции. Все это не позволит широко использовать эти методы с тем чтобы их применение достигло значимого уровня, по крайней мере в ближайшие годы.

Сегодня для постановки диагноза на сибирскую язву вряд ли достаточно результатов только ПЦР без применения классических методов. Представляется более предпочтительной следующая схема: постановка диагноза всеми доступными классическими методами. А вот для проведения более тонкого и углубленного эпизоотологического анализа вспышек болезни можно использовать генотипические методы. Они позволят выявить штаммовые различия, изучить происхождение штамма (или штаммов), пути его заноса, распространение штаммов, вызывающих заболевание в разных странах, эволюцию возбудителя. Эти методы помогут провести надеж-

ную и точную дифференциацию между *Bac.anthraxis* и *Bac.cereus*, наиболее близкими видами рода *Bacillus*.

По обсуждаемой проблеме за последнее десятилетие опубликовано большое количество работ, которые невозможно представить в данном издании даже в кратком изложении. Поэтому мы коснемся только отдельных вопросов, не нашедших отражения в ранее опубликованных монографиях, поставив перед собой цель – показать результаты на стратегических направлениях.

Обстоятельный анализ диагностики сибирской язвы у сельскохозяйственных животных стандартными, традиционными методами представлен авторами монографии «Сибирская язва» (М., 1996) Н.Г.Ипатенко, В.А.Гавриловым и др.

Описана методика взятия патологического материала и проб из различных объектов (корма, вода, почва, кожевенное сырье), порядок проведения лабораторных исследований, в том числе ветеринарно-санитарная экспертиза туш; учтены особенности постановки диагноза у свиней, методы обогащения проб.

Авторы представили комплекс микробиологических методов, используемых в ветеринарных лабораториях. Перечислим описанные методы: микроскопические (приготовление мазков, окраска по Граму, Михину, Ребигеру, Ольту, Романовскому-Гимзе, люминесцирующими сыворотками), посев на питательные среды, биологическая проба (белые мыши, морские свинки, кролики), различные методы окраски спор, в том числе флуорохромами, серологические – реакция преципитации (горячий и холодный способы). Порядок идентификации: подробнейшим образом описана проба бактериофага во всех применяемых модификациях (включая приготовление культуральных сред, учет результатов), чувствительность к пенициллину (тест «жемчужного ожерелья»).

Из других методов ускоренной диагностики описана реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), выявление капсулы *in vitro* и *in vivo*, реакция прямой флуоресценции для выявления вегетативных клеток, непрямой метод с использованием системы фаг – флуоресцентный антифаг, а также с использованием капсульных сибиреязвенных сывороток, метод ускоренной диагностики с применением флуоресцирующих антител.

Представлены также в сравнительном аспекте культурально-морфологические и биологические признаки некоторых близкородственных почвенных бацилл и *Bac.anthraxis*.

В настоящее время уже накоплен большой экспериментальный материал о взаимодействии многих бактерий с лектинами. Лектины

— белки, выделенные из различных частей растений, микробных клеток, из клеток млекопитающих. Все они обладают общим свойством узнавать и обратимо связывать углеводы или углеводосодержащие структуры, в том числе гликопротеины, полисахариды, липиды и др. Лектины используются как своего рода неиндуцированные антитела, для визуализации, характеристики и связывания углеводов на клеточной поверхности бактерий (Н.Л.Калинин, 1995). Для некоторых бактерий в отношении взаимодействия с лектинами установлены межвидовые, межштаммовые и внутриштаммовые различия. Именно это свойство привело ряд исследователей к решению замены лектинами антител в традиционных иммунодиагностикумах.

Е. Brown et al. (1950) предложили способ, основанный на взаимосвязи лектина из *Glycine max* (агглютинин сои) с полисахаридом клеточной стенки вегетативных форм (D-галактоза и N-ацетил-D-глюкозоамин) *Bac.anthraxis*. K. Graham et al. (1984) и J. Ezzel et al. (1988) высказали мнение, что данный полисахарид уникален только для *Bac.anthraxis*, в его присутствии можно серологически отличать возбудителя сибирской язвы от *Bac.cereus*. Для получения моноклональных антител *Bac.anthraxis* использовали частично очищенный гуанидин — HCL экстракт клеточных стенок вегетативных клеток (J. Ezzel et al., 1990).

Значительные исследования проведены R. Doyle et al. По мнению авторов, из-за сильной перекрестной серологической активности антигенов представители бацилл из группы антракса не проявляют иммунохимических межвидовых различий.

Оказалось, что *Bac.anthraxis* и *Bac.mycoides* избирательно агглютинируются лектинами сои, а *Bac.cereus* и *Bac.thuringiensis* не агглютинируются. В то же время последний агглютинируется лектинами из *Helix pomatia* ag. Использование «лектиноферментного» метода позволяет с высокой степенью чувствительности и специфичности идентифицировать *Bac.anthraxis*. Набор лектинов из гороха наряду с лектинами из риса и пшеницы позволил идентифицировать некоторые сероварианты *Bac.thuringiensis* по соматическим антигенам.

Н.Л.Калинин (1995) изучил возможность применения различных меток для количественного определения клеток *Bac.anthraxis* вакцинного штамма СТИ с помощью агглютинина сои. Исследовали возможность использования агглютинина сои, меченного пероксидазой, биотином, ФИТЦ и золотом, чтобы определить количество клеток *Bac.anthraxis* в вакцинном штамме СТИ. Показано, что метод, основанный на взаимодействии между лектином и стенками

137
микробной кл.
варианты. Чу
мл (биотин) д
линии, К.Л.И
Таким обр
из группы ан
углеводосод
жается усове
ные и чувств
Во ВНИИ
ции (РНГА)
дования сыв
язвенных ан
от постинфе
кулов, 1989;
няемый эрит
бор антиген
антител.
Реакция
нации не ме
для кролико
Одним из
цистеин, поз
следования
ных против
ных и пере
7S. При обр
антитела ра
дифференци
ных.
Сотрудн
В.А.Пятко
работан эр
РНГА спор
спор в 1,
Bac.megate
Разрабо
ментного те
фицировать
от родствен

микробной клетки, не менее чувствителен, чем традиционные ELISA варианты. Чувствительность метода изменялась от 10^4 клеток в 1 мл (биотин) до 10^5 – пероксидаза и 10^6 – золото и ФИТЦ (Н.Л. Калинин, К.Л. Шаханина, М.Н. Кулякина, 1993).

Таким образом, установлена возможность идентификации бацилл из группы антракса с использованием лектинов, связывающихся с углеводосодержащими структурами бактериальной клетки. Продолжается усовершенствование метода, используются все более сложные и чувствительные автоматизированные способы детекции.

Во ВНИИВВиМ разработана реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), которую применяют в отдельных случаях для исследования сывороток крови животных с целью обнаружения сибиреязвенных антител и дифференциации поствакцинальных антител от постинфекционных (В.М. Котляров, Л.Ф. Николайчук, И.А. Бакулов, 1989; В.М. Котляров, Николайчук Л.Ф. и др., 1998). Применяемый эритроцитарный диагностикум содержит более полный набор антигенов, позволяющий выявлять наиболее широкий спектр антител.

Реакция признается положительной при обнаружении агглютинации не менее чем на 2 креста в разведениях сывороток крови 1:80 для кроликов, 1:160 для овец и 1:320 для крупного рогатого скота.

Одним из компонентов данного набора является солянокислый цистеин, позволяющий установить молекулярный тип антител. Исследования показали, что в организме животных, иммунизированных против сибирской язвы, образуются антитела типа 19S. У больных и переболевших животных в РНГА выявляются антитела типа 7S. При обработке солянокислым цистеином сывороток крови 19S антитела разрушаются, а 7S сохраняются. Таким образом, можно дифференцировать поствакцинальные антитела от постинфекционных.

Сотрудниками НИИ микробиологии (г. Киров) Д.А. Кутаевым, В.А. Пятковым, Г.Д. Елагиным, П.Г. Васильевым (1998) также разработан эритроцитарный диагностикум, позволяющий выявлять в РНГА споры сибиреязвенного микроба в концентрации $(195...780)10^3$ спор в $1,0\text{ см}^3$ и не реагирующий на культуры *Bac. cereus*, *Bac. megaterium*, *Bac. subtilis* в концентрации $1,0 \cdot 10^8$ спор в $1,0\text{ см}^3$.

Разработан диагностический набор для постановки иммуноферментного твердофазного «сэндвич»-анализа, позволяющего идентифицировать возбудителя сибирской язвы и дифференцировать его от родственных видов спорообразующих бацилл.

Сравнительная оценка чувствительности различных серологических реакций, используемых для выявления антигенов сибиреязвенного микроба, показала, что «сэндвич» - метод с использованием разработанного авторами диагностического набора превосходит по чувствительности прямой иммуноферментный в 50-100 раз, реакцию торможения непрямой гемагглютинации – в 100-200 раз, реакцию диффузионной преципитации – в 500-1000 раз (Л.Ф.Николаичук и др., 1998).

J. Bugans, A. Kelerher et al. (1996) разработали быстрый метод для обнаружения протективного антигена *Bac.anthraxis* в крови, сыворотке и других жидкостях организма у инфицированных животных и человека с использованием иммунохроматографической мембраны. Антиген улавливается моноклональными антителами, связанными с нитроцеллюлозной мембраной, а вторые моноклональные антитела, специфичные к различным эпитопам, связанные с частицами коллоидного золота, являются реагентами для его детекции. Для проведения реакции требуется 10 минут, наименьшее количество антигена, обнаруживаемого за одну стадию, равняется 25 нг/мл. При оценке панели положительных и негативных сывороток подтверждена высокая чувствительность метода и его 100-процентная специфичность при концентрации мишени 25 нг/мл. По чувствительности он оказался одинаковым с методом ELISA при использовании одинаковых реагентов, но последний требует для проведения реакции 4 часа.

А.К.Галиуллин, В.П.Коксин и др. (1996) выделили растворимые антигены из спор разных штаммов *Bac.anthraxis* и *Bac.cereus*. Выявлена мажорная серопозитивная фракция с молекулярной массой 90 кДа, обладающая высоким аффинитетом (100%) к *Bac.anthraxis* и отсутствующая у *Bac.cereus*. При использовании в иммуноблоттинге гипериммунной сыворотки к этому антигену отмечали четкую реакцию с антигенными структурами фракционированных спор вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ и вирулентного Ч-7 при отсутствии специфического фона с *Bac.cereus*, что позволяет быстро и достоверно идентифицировать споры этих двух бацилл.

Продолжаются исследования по усовершенствованию традиционных методов для выделения *Bac.anthraxis* из проб окружающей среды.

Культивирование сибиреязвенного микроба на питательных средах не вызывает затруднений, он хорошо культивируется на обычных средах – МПБ и МПА. Трудности возникают при выделении возбудителя сибирской язвы из объектов внешней среды (почва,

139
фураж, смывы с
тью объектов спо
нантов. Пробле
теля такой дифф
гибиторов, котор
щей микрофлоры
микроба.

В отечествен
применяются. И
тик полимиксин
средство «Прогр
бавлением боль
сравнению со с
фосфатазы.

Проанализир
няемых для эти

Сотрудникам
Великобритани
сред для выде
(J.Bowen, I.Nep

В этой лабор
среда с добавлен
сусной кислоты,
et al., 1993).

Эту среду с
гащенным бул
Bac.anthraxis в
селективной сре
смеси видов *Bac*

среда PLETA.
рост посторонн
PLETA были т
тивность сред
дца крупного
бавки различн
ная пропись R
ты.

Этилендиа
ственной доба
ацетат талия, н
нация этих ко

фураж, смывы с поверхностей и др.) и обусловлены обсемененностью объектов спорами почвенных сапрофитов и других контаминантов. Проблема заключается в подборе для выделения возбудителя такой дифференциально-диагностической среды с набором ингибиторов, которые бы избирательно подавляли рост сопутствующей микрофлоры и не оказывали влияния на рост сибиреязвенного микроба.

В отечественной ветеринарной практике такие среды успешно применяются. Известная среда с набором ингибиторов – антибиотик полимиксин, гризеофульвин, налидиксовая кислота и моющее средство «Прогресс» – использовалась также в модификации с добавлением большей концентрации фенолфталейнфосфата натрия по сравнению со стандартным образцом для обнаружения щелочной фосфатазы.

Проанализируем отдельные результаты по подбору сред, применяемых для этих целей за рубежом.

Сотрудниками Центра прикладной микробиологии (Портон Даун, Великобритания) изучена эффективность нескольких селективных сред для выделения *Bac. anthracis* из проб окружающей среды (J. Bowen, I. Henderson, P. Turnbull, 1996).

В этой лаборатории для указанной цели используется агаровая среда с добавлением полимиксина, лизоцима, этилендиаминтетрауксусной кислоты, ацетата талия (PLETA) (R. Knisely, 1966; P. Turnbull et al., 1993).

Эту среду сравнивали с другими селективными агарами и обогащенным бульоном. Были испытаны пробы, обсемененные *Bac. anthracis* в естественных условиях и в лаборатории. Лучшей селективной средой, обеспечивающей больший рост *Bac. anthracis* из смеси видов *Bacillus* в естественно контаминированных пробах, была среда PLETA. На ней росли характерные колонии *Bac. anthracis*, рост посторонней флоры был значительно меньшим. Компоненты PLETA были также самыми эффективными, повышающими эффективность среды, при добавлении их в бульоны. Отвар мозга и сердца крупного рогатого скота был наилучшей основной средой, а добавки различных концентраций химических веществ (оригинальная пропись R. Knisely, 1966) обеспечивали оптимальные результаты.

Этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) была более существенной добавкой для селективного роста бацилл антракса, чем ацетат талия, но наилучший селективный рост обеспечивала комбинация этих компонентов.

Внесение пробы почвы больше 2% (вес/объем) в PLET бульон предотвращало селективный рост *Bac.anthraxis*, что было обусловлено наличием в почве минеральных ионов, хелатирующих, образующих комплексы с EDTA и, следовательно, предотвращающих ее синергизм с талисм.

Увеличение концентрации хелатирующих агентов (EDTA, Chelex) приводило к удалению избытка отдельных ионов и восстановлению селективности бульона (Табл. 24).

Таблица 24.

- 1) Влияние селективности PLET бульона при добавлении EDTA (хелатирующей кальций) с 0,0025M CaCl_2 ;
2) при добавлении Chelex (хелатирующей железо) с 0,0025M FeCl_2 (по J.Bowen et al., 1996)

1)

	Концентрация EDTA (мг/л)	Процент роста <i>Bac.anthraxis</i>
PLET без добавок	300	95
PLET + CaCl_2	300	10
PLET + CaCl_2	500	70
PLET + CaCl_2	600	80
PLET + CaCl_2	700	90

2)

	Добавлен Chelex (г)	Процент роста <i>Bac.anthraxis</i>
PLET	0	95
PLET + FeCl_2	0	20
PLET + FeCl_2	0,5	75

J.Bowen et al. (1996) изучали влияние различных веществ на степень прорастания спор *Bac.anthraxis* из смеси со спорами родственных видов бацилл. Максимальное прорастание спор *Bac.anthraxis* отмечено при использовании 10mM L-аланина, 1mM инозина или 10mM L-аланина и 2mM аденозина. Однако разделить этим способом споры *Bac.anthraxis* и *Bac.cereus* не удалось в связи с равной степенью их прорастания.

По-прежнему находят применение и традиционные методы дифференциации *Bac.anthraxis* от спорообразующих почвенных бацилл. Как известно, бактериофаги *Bac.anthraxis* распространены довольно широко. Они обнаружены в почве, сточных водах, испражнениях животных, длительно хранящихся музейных сибиреязвенных культурах. Феномен фаголизиса – растворения бактерий под воздействием фага – используют для дифференциации возбудителя сибирской язвы от анаэробных сапрофитных бацилл.

В настоящее время согласно методическим указаниям по лабораторной диагностике сибирской язвы у животных и людей, а также для обнаружения данного возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды используют фаги «К-ВИЭВ», «Гамма-МВА» и «Fah-ВНИИВВиМ» биофабричного производства.

В экспериментах по определению фагочувствительности культур возбудителя сибирской язвы вирулентных и вакцинных штаммов использовали вышеназванные фаги, а также специально изготовленные в ВГНКИ серии этих фагов (Н.Г.Ипатенко, 2000). Из 244 эпизоотических сибиреязвенных штаммов 95% были чувствительными к коммерческим фагам «К-ВИЭВ» и «Гамма-МВА» и 97% к фагу «Fah-ВНИИВВиМ»; 11 оказались устойчивыми к фаголизису. Бактериофаги, изготовленные в ВГНКИ, лизировали 239 эпизоотических штаммов (98%). Вакцинные сибиреязвенные штаммы были чувствительными ко всем испытуемым фагам (100%). Испытуемые фаги не лизировали культуры аэробных сапрофитных бацилл (23 штамма). Следовательно, этот метод можно использовать для дифференциальной диагностики сибирской язвы от родственных бацилл при лабораторных исследованиях.

Несмотря на то, что видоспецифические сибиреязвенные бактериофаги широко используются для идентификации *Bac.anthraxis*, вопросы внутривидового типирования изучены недостаточно. Изучали чувствительность 89 штаммов *Bac.anthraxis*, выделенных от людей, крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, а также из кожаного сырья и сточных вод сырьеперерабатывающих предприятий, к 10 видоспецифическим бактериофагам (гамма. Ф4, Ф9, Ф28, Ф47, Ф47/1, Ф49, Ф56, Ф59, ФЮИ). Изучаемые штаммы были разделены на 3 группы: 69 (77,53%) штаммов – чувствительные ко всем бактериофагам; 3 (3,37%) штамма – устойчивые ко всем бактериофагам; 17 (19,1%) штаммов – гетерогенные по чувствительности к бактериофагам (П.Г.Васильев, Ю.И.Иванов и др., 1998). Таким образом, установлена принципиальная возможность внутривидового типирования *Bac.anthraxis* по спектру чувствительности к видоспецифическим сибиреязвенным бактериофагам.

Н.Г.Ипатенко, А.А.Маничев и др. (1995) проверили 40 штаммов *Bac.anthraxis* и 43 штамма сходных с ними антракоидов. Авторы считают ошибочными рекомендации об исключении фактора подвижности из перечня главных дифференциальных признаков диагностики. Кроме того, следует учитывать факт частого выделения патогенных вариантов *Bac.sereus*, которые дают положительную биопробу на белых мышах.

На основании собственных и литературных данных авторы считают, что тест «жемчужного ожерелья», реакцию преципитации в геле, реакцию непрямой гемагглютинации можно успешно использовать в комплексе с другими бактериологическими методами (микроскопия, культивирование в МПБ и МПА, исследование на подвижность, спорообразование, биопроба на лабораторных животных) для дифференциальной диагностики возбудителя сибирской язвы от ложносибиреязвенных микробов.

Использование **генотипических методов** позволяет выявлять не фенотипическое проявление, а непосредственно исследовать молекулярную структуру генома, выявлять генетическую вариабельность, устанавливать генетическую взаимосвязь штаммов.

Из этих методов в настоящее время наиболее широко применяются рестрикционный анализ, методы молекулярной гибридизации, полимеразная цепная реакция. Кратко опишем возможности и суть методов (А.Г.Бадашкеева, Д.Г.Кнорре, 1991; И.А.Шагинян, А.Л.Гинцбург, 1991; М.Ю.Аксенов, А.Л.Гинцбург, 1993).

Рестрикционный анализ. Благодаря способности ферментов рестрикции производить расщепление ДНК в строго фиксированных местах препарат ДНК после обработки рестриктазами дает набор однотипных фрагментов (рестриктов). При разделении электрофорезом в агарозном или полиакриламидном геле фрагменты рестрикции, мигрируя в соответствии с молекулярными массами, образуют характерную для данной ДНК картину – профиль рестрикции. На этом основано широкое применение рестрикционного анализа для исследования геномов микроорганизмов, в том числе возбудителя сибирской язвы.

Рестрикционные карты используют для определения родства бактерий, установления вариаций последовательностей ДНК внутри популяций, изучения изменений геномов в процессах аттенуации, пассирования в различных системах, адаптации к отдельным хозяевам. Сопоставление профилей рестрикции и физических карт обеспечивает более определенный, дополнительный подход по сравнению с фенотипическими характеристиками в решении таксономических и эпизоотологических вопросов.

Идентичные рестрикционные картины для различных изолятов предполагают общий источник их происхождения или близкое родство, в то время как значительные отклонения будут указывать на противоположное. Рестрикционный анализ позволяет дифференцировать изоляты на основании строения их геномов, идентифицировать новые изоляты путем сопоставления их рестрикционных профилей с таковыми уже известных изолятов.

Метод молекулярной гибридизации базируется на комплементарности оснований нуклеотидов в цепях нуклеиновых кислот. Наличие в биологическом образце определенных последовательностей может служить наиболее специфичным критерием присутствия в них определенных генов. Выявить их можно путем гибридизации нуклеиновых кислот этого образца с зондами, представляющими собой поли- или олигонуклеотиды, последовательность которых комплементарна анализируемой. Такой метод анализа получил название метода молекулярной гибридизации. По своей специфичности он не уступает иммунохимическим методам, а дополняет их.

Методы генетического зондирования, в основе которых лежит реакция ДНК-ДНК-гибридизации, при наличии специфических зондов позволяют точно определить видовую принадлежность микроорганизмов.

Способы получения зондов в настоящее время достаточно хорошо разработаны. Как известно, зонд представляет собой олиго- или полинуклеотид, несущий в ряде случаев дополнительный фрагмент ненуклеотидной природы — репортерную группу, необходимую для детекции гибридизации. Нуклеотидный зонд можно получить либо на детектируемой ДНК с помощью ДНК-полимеразы, либо на детектируемой молекуле РНК с помощью обратной транскриптазы. Лучше использовать однонитчатые зонды.

Для клонирования нуклеотидных последовательностей, выступающих в роли ДНК-зондов, используют плазмидные векторы. Их недостатком является невозможность накапливать ДНК-зонд в одноцепочечной (оц) форме, которая является идеальной для проведения ДНК-ДНК-гибридизации.

Векторы для клонирования на основе фагов из серии M13mp являются удобным источником накопления больших количеств оц ДНК, обладая всеми преимуществами плазмидных векторов серии pUC и использования простого и прямого колориметрического теста, позволяющего выявлять наличие встроенной ДНК (С. Yanisch-Perron, J. Vieira, J. Messing, 1985). Кроме того, в оц ДНК-зонды можно легко и эффективно вносить радиоактивную метку, используя

простую технику достройки праймера. Такая процедура, в отличие от метода ник-трансляции, обеспечивает получение ДНК-зондов с более высокой удельной радиоактивностью (J. Messing, 1983).

Другой перспективный вариант получения однонитевых зондов основан на синтезе РНК с помощью РНК-полимераз бактериофагов SP6 и T7 на двунитевой матрице, содержащей необходимую последовательность.

Имеются также хорошо разработанные методы получения олигонуклеотидных зондов с последовательностью, комплементарной к исследуемому участку детектируемой нуклеиновой кислоты — химический синтез с помощью автоматических ген-синтезаторов, позволяющие получать зонды к любым выбранным последовательностям.

Использование олигонуклеотидных зондов возможно в том случае, если известна первичная структура детектируемой нуклеиновой кислоты. Достоинствами олигонуклеотидных зондов являются большая скорость их гибридизации с мишенью и легкость введения в синтетические олигонуклеотиды группировок, необходимых для последующего введения фрагментов, обеспечивающих далее чувствительную детекцию зонда.

Высокая чувствительность метода гибридизации обеспечивается использованием радиоактивной метки. В основном использовали зонды, меченные изотопом ^{32}P . Метку вводят либо в 5'-конец нуклеотидной последовательности с помощью полинуклеотидкиназы, либо путем ник-трансляции внутрь цепи.

Недостатком радиоактивных зондов является их нестабильность и радиоационная опасность. Поэтому проводятся исследования по созданию зондов, которые можно определять не радиохимическими методами, а в основном спектроскопическими. В зонды вводят специальные группы, которые можно обнаруживать оптическими методами.

Непосредственное использование адсорбционной спектроскопии малоперспективно ввиду ее малой чувствительности, и основное внимание уделяется существенно более чувствительным радиоактивным методам.

Используются ферменты (пероксидаза, щелочная фосфатаза), способные катализировать образование большого числа окрашенного продукта, который далее регистрируется спектрофотометрически; вводят также биотин, авидин, гаптены.

В последнее время уделяется большое внимание методу определения полиморфизма длин рестриктазных фрагментов (ПДРФ),

145
позволяющему вы-
ков гидролиза опр-
одного нуклеотида
ния для фрагмент-
Каждая из
фрагментов ДНК
электрофореза. За-
люозный или ней-
на этом фильтре с
последовательности
фильтра можно ч-
полос, соответству-
ный ген.

Другой вариан-
гибридизация. Он
ных олиго- и полин-
разными участками

Вместе с тем м-
рых является нео-
полиморфизма. П-
вить только при
хромосомных ДНК
кулярной массы, ф-
анализировать даж-
дифференциации
ности возникают пр-
иметь существенно

Поэтому, хотя
ный шаг вперед и
циацию ДНК возбу-
тов, необходимость
ограничивают

В связи с не-
выявления геном-
номная дактилоск-
трикционного ана-

Было установ-
гибридизоваться с
риотов. Гипервар-
можно испол-
чрезвычай

позволяющему выявлять тонкие различия в распределении участков гидролиза определенными эндонуклеазами. Замена хотя бы одного нуклеотида в гене сразу же изменит характер распределения длин фрагментов.

Каждая из нуклеаз дает характерный набор рестриктазных фрагментов ДНК, которые могут быть разделены с помощью гелеэлектрофореза. Затем фрагменты переносят на фильтр (нитроцеллюлозный или нейлоновый) и далее проводят гибридизацию ДНК на этом фильтре с меченым зондом, содержащим комплементарные последовательности к исследуемому гену. После радиоавтографии фильтра можно четко выявить хорошо воспроизводимый набор полос, соответствующих фрагментам ДНК, которые содержат данный ген.

Другой вариант проведения анализа известен как «сэндвич»-гибридизация. Он предполагает использование двух комплементарных олиго- и полинуклеотидных фрагментов, взаимодействующих с разными участками анализируемой нуклеиновой кислоты.

Вместе с тем метод ПДРФ имеет недостатки, основным из которых является необходимость подбора рестриктазы для выявления полиморфизма. ПДРФ близкородственных штаммов можно выявить только при использовании нескольких рестриктаз. ПДРФ хромосомных ДНК – это обычно 50 и более полос различной молекулярной массы, формирующих сложную картину, которую трудно анализировать даже с помощью компьютерной обработки. А при дифференциации близкородственных штаммов еще большие трудности возникают при идентификации минорных полос, которые могут иметь существенное значение.

Поэтому, хотя исследование ПДРФ и представляет значительный шаг вперед и позволяет проводить внутривидовую дифференциацию ДНК возбудителей, трудности в интерпретации результатов, необходимость подбора рестриктаз для ПДРФ существенно ограничивают использование этого подхода в практической работе.

В связи с недостатками ПДРФ была разработана методика выявления геномного полиморфизма с помощью ДНК-зондов (геномная дактилоскопия). Сущность метода состоит в сочетании рестрикционного анализа с гибридизацией специфическими зондами.

Было установлено, что ДНК фагового вектора M13 способна гибридизоваться с ДНК многих видов как эукариотов, так и прокариотов. Гипервариабельную последовательность в ДНК фага M13 можно использовать как природную пробу, способную выявлять чрезвычайно высокий уровень полиморфизма. По аналогии с иден-

тификацией человека по рисунку капиллярных линий специфические для индивидуумов картины гибридизации были названы «дактилоскопическими отпечатками ДНК» (англ. DNA fingerprinting), а метод — «геномной», или «ДНК-дактилоскопией».

Следует, однако, отметить, что наиболее перспективной и самой чувствительной оказалась *полимеразная цепная реакция (ПЦР)*. По этой проблеме выполнено большое число исследований и опубликовано статей. Разработано уже несколько вариантов реакции. Применение ПЦР и молекулярной гибридизации позволяет проводить диагностику бактериальных и вирусных болезней с более высокой чувствительностью и специфичностью, чем определение специфических антител и антигена, и количественно обнаружить микроорганизмы, присутствующие в очень низких концентрациях (1-10 возбудителей в пробе). При этом ДНК инфекционных агентов может быть достаточно эффективно экстрагирована из любой биологической жидкости или ткани, а также проб объектов окружающей среды (почва, вода, корма и т.д.), продуктов питания и др.

Суть реакции состоит в многократном самокопировании (амплификации) определенного участка нуклеиновых кислот в присутствии соответствующих полимераз, что обеспечивает выявление наличия в исследуемом объекте даже единичных молекул нуклеиновой кислоты.

ПЦР — циклический процесс, при котором в каждом цикле происходит удвоение числа тестируемых молекул. Процесс удвоения повторяют 20-30 раз до получения миллионов копий исходной молекулы ДНК, которая становится доступной для выявления малочувствительными, но достоверными методами, например, электрофорезом в геле с окраской фракции ДНК бромидом этидия, ярко светящейся в УФ-лучах, и другими методами.

В настоящее время наиболее развита амплификация с помощью ДНК-полимераз. Добавляя к исследуемой ДНК-мишени ДНК-полимеразу *I E.coli* (EcoRI), набор праймеров и нуклеозидтрифосфатов, можно удвоить количество мишеней, предварительно её денатурировав и проводя репликацию на каждой из нитей. В следующем цикле надо денатурировать полученные дуплексы и снова повторить цикл репликации. Теоретически после проведения 20 циклов можно увеличить содержимое материала в 10^6 раз. Практически эффективность достигает 85% от теоретически возможной.

Возможности этого метода возросли с использованием термостабильной ДНК-полимеразы из термофильных бактерий, сохраняющей свою активность в среде до 95°C. Это позволяет при получе-

147
нии копии ДНК
активности этого
ния дополните
меризации. Пос
его автоматиз
ствляется при
ческих амплиф
ки.
Проанализи
ные вышеописа
Результаты
13 изолятов Ва
пиролиз-масс
цировали мног
от 12 других п
Авторы считаю
рый и относит
зован для диф
ных микроор
Проводятс
принтинга с п
11 штаммов ба
звляют пров
цию (J. Bright
V. Korsuk
дических под
ным, эффект
пользованием
идентична, н
M. Lee et
ампликонов
ими флуоре
Используй
мерами, G.
Vas. cereus
помощью э
ледователь
Vas. anthrac
лекулярног
того, он по
штаммов В.

нии копии ДНК спизить ошибки, возникающие вследствие потери активности этого фермента, и исключить необходимость добавления дополнительных порций фермента после каждого цикла полимеризации. Последнее обстоятельство упрощает метод и позволяет его автоматизировать. Реакция плавления ДНК чаще всего осуществляется при 91-95°C, а реакция синтеза – при 55-60°C. В коммерческих амплификаторах эти условия обеспечиваются автоматически.

Проанализируем результаты изучения сибирской язвы, полученные вышеописанными методами.

Результаты геномной дактилоскопии 13 штаммов *Bac.anthraxis* и 13 изолятов *Bac.cereus* и *Bac.thuringiensis* определяли посредством пиролиз-масс-спектрометрии. Кроме того, этим методом дифференцировали многочисленные субкультуры одного штамма *Bac.anthraxis* от 12 других штаммов того же вида (P.Sisson, L.Lightfoot, 1996). Авторы считают, что пиролиз-масс-спектрометрия – простой, быстрый и относительно недорогой метод, который может быть использован для дифференциации изолятов антракса от близкородственных микроорганизмов.

Проводятся эксперименты по определению результатов фингерпринтинга с помощью лазерной масс-спектрометрии. При изучении 11 штаммов бацилл обнаружены характерные спектры, которые позволяют проводить межвидовую и межштаммовую дифференциацию (J.Bright et al., 1998).

V.Korsukov et al. (1998) провели сравнительную оценку методических подходов для регистрации результатов ПЦР. По их данным, эффективность и частота обнаружения ПЦР-ампликонов с использованием гелеэлектрофореза и красителя этидия бромиды была идентична, но использование красителя более экономично.

M.Lee et al. (1998) считают реалистичным обнаружение ПЦР-ампликонов в течение 10 минут при использовании разработанных ими флуоресцентных методов в пробирках.

Используя модификацию ПЦР с флуорофорсвязанными праймерами, G. Patra, G. Bolus et al. (1998) дифференцировали штаммы *Bac.cereus* друг от друга и от *Bac.thuringiensis* и *Bac.anthraxis*. С помощью этого метода в комбинации с детекцией Ba813 ДНК последовательности авторы могли также дифференцировать штаммы *Bac.anthraxis*. Этот способ обеспечивает быстрое определение молекулярного эпидемического типа штаммов группы *Bac.cereus*. Кроме того, он подтверждает более ранние заключения о близком родстве штаммов *Bac.cereus* и *Bac.anthraxis*.

Посредством ПЦР – ELISA модификации и маркировки мишени ДНК дигексигенином R.Bohm et al. (1998) могли обнаружить 4 споры *Bac.anthraxis* в 100 г почвы. Результаты, полученные от исследования более 500 проб окружающей среды, показывают, что могут случаться ложноположительные реакции, особенно с пробами из микробиологически активных слоев почвы.

Сравнивали эффективность 16S и 23S-зондов для типирования штаммов *Bac.anthraxis*. Чтобы избежать неблагоприятного воздействия радиоактивной метки, использовали мечение ацетиламинофлуореном или дигексигенином. Эти зонды обеспечивали более отчетливые полосы по сравнению с меткой ^{32}P . Лучшие результаты получены при расщеплении геномной ДНК следующими эндонуклеазами: Acc I, Dra I, EcoR I и Hind III. С Dra I размер фрагментов составлял от 2,3 до 3,4 к.б. и от 1,9 до 4,4 к.б. при использовании 16S – 493 фрагмента и 23S – 508 фрагмента соответственно в качестве зонда. Самые информативные образцы и лучшие полосы получили с 23S – 508 зондом (G.Patra, P.Sylvestre et al., 1996).

V.Ramisse et al. (1996) усовершенствовали ПЦР, разработав многомишеневой метод, использующий плазмидные и хромосомальные маркеры. ПЦР была успешно осуществлена с парами олигонуклеотидных праймеров – 67/68, 25/26, 3/4, 57/58, RI/R2. Специфичность этого метода испытана на 31 штамме *Bac.anthraxis* и 11 штаммах 10 других видов бацилл. Этим методом можно было легко отличить штаммы, лишенные плазмид (pX01/pX02), *Bac.anthraxis* от *Bac.cereus*. Полученные результаты показывают ценность сконструированных олигонуклеотидных, плазмидных и хромосомальных маркеров для идентификации авирулентных и вирулентных штаммов сибирской язвы и дифференциации от близкородственных видов бацилл.

Для идентификации *Bac.anthraxis* посредством ПЦР широко используются хорошо изученные факторы вирулентности *lef*, *суа*, *rag* и *сар*, локализованные на плазмидах pX01 и pX02. G.Patra, P.Sylvestre et al. (1996) для идентификации маркера, специфичного для хромосомы *Bac.anthraxis*, сконструировали космидную библиотеку из штаммов, у которых отсутствовали плазмиды (pX01/pX02). Скрининг этой библиотеки в Соузерн блоте привел к идентификации последовательности, определенной как Ba 813, специфичной для хромосомы *Bac.anthraxis*, отсутствующей у других видов рода *Bacillus*.

ПЦР проводили с праймерами RI и R2, выделенными из Ba 813 и ДНК из различных видов *Bacillus*. Амплификацию фрагмента 152 п.о. наблюдали только со штаммами, относящимися к *Bac.anthraxis*.

На основании результатов ПЦР и фингерпринтинга установлено, что штаммы *Bac.anthraxis* предстают высоко консервативными как на фенотипическом, так и генотипическом уровнях. Результаты означают, что клоновая популяция является только началом проявления признаков независимой изменчивости. Это, возможно, отражает то, что облигатный патоген *Bac.anthraxis* может размножаться, когда возникает благоприятный случай для инфицирования подходящего хозяина, и что для любого отдельного штамма это редкий случай. Напротив, эти факты могут также указывать и на то, что эволюция микроорганизма из предшественника, подобного *Bac.cereus*, происходила только относительно недавно (I.Henderson, 1996).

По мнению J.Ezzel et al. (1998), наиболее надежными тестами для идентификации *Bac.anthraxis* являются тесты на чувствительность к гамма фагу, обнаружение галактозо/N-ацетилглюкозамин полисахарида и поли-Д-глутаминовой кислоты, наличие генов токсина и капсулы, определяемых посредством ПЦР. Наименее надежными являются биохимические профили, основанные на утилизации субстрата.

Для точного определения источника вспышки сибирской язвы необходимо изучение разных изолятов *Bac.anthraxis* генотипическими методами. Опубликовано большое количество работ по этой проблеме зарубежных исследователей из США, Великобритании (P.Keim, Ch.Kuske, K.Hill, K.Richmond, D. Adair, K.O'Donoghue, M.Hugh-Jones, A.Kalif, K.Wilson, G.Andersen, A.Friedlander, J.Simoni, P.Turnbull и др.).

Представляем некоторый итоговый анализ, сделанный M.Hugh-Jones и изложенный им в докладе на Международном симпозиуме по сибирской язве, состоявшемся в 1997 году в Алма-Ате (Казахстан), и в статье P.Keim et al.(1997). Подробно цитируем представленные в них данные, которые отражают уровень изученности изменчивости сибиреязвенного микроба, штаммовых различий, его эволюции.

Для изучения сходства среди разных штаммов *Bac.anthraxis* молекулярные биологи обычно выбирают мишенью специфические последовательности генов, известных среди бактериальных видов и штаммов своей изменчивостью. Исследование этих последовательностей у разных штаммов *Bac.anthraxis* показало: идентичность 16S рибосомальных ДНК последовательностей у всех известных изолятов; идентичность 16S-23S рибосомальных последовательностей межгенного региона; идентичность межгенного региона между гиразой А и гиразой В генов. Образцы фрагмента ДНК при использо-

вании 18 различных рестрикционных энзимов и образцы, использующие 10 разных ПЦР праймеров, были идентичны для всех изолятов.

Все это позволяет сделать вывод о наличии среди штаммов *Bac.anthraxis* лишь небольших генетических различий. После нескольких лет изучения был идентифицирован только один генетический locus, который изменялся в зависимости от штамма. Был разработан метод, позволяющий идентифицировать эти различия в ДНК разных штаммов сибиреязвенного микроба. Идея метода заключается в получении фрагментов ДНК для каждого штамма *Bac.anthraxis* с помощью эндонуклеаз рестрикции, которые разрывают молекулы ДНК в бактериальном геноме через точно определенные последовательности.

Образец полученных фрагментов должен быть идентичен для двух идентичных изолятов. Однако он должен меняться, если имеются различия в геноме, основанные на различиях среди штаммов. Так как все изменения между штаммами должны располагаться в ДНК последовательности, этот метод должен показывать различия в геноме.

Разрыв двумя энзимами *EcoRI* и *MseI* дает образец, специфичный для используемых энзимов и штамма, из которого была выделена ДНК. Однако использование 2-х энзимов дает слишком много фрагментов, что затрудняет анализ. Эти затруднения преодолеваются с помощью метода определения полиморфизма длины амплифицированного фрагмента (ПДАФ). Не вдаваясь в детали его описания, отсылаем читателя к первоисточникам. Скажем лишь, что используемый метод заключается в избирательном амплифицировании только специфического набора фрагментов, выработанных ферментативным гидролизом. Создана также автоматизированная система для анализа ПДАФ профилей, позволяющая хранить фрагменты из разных экспериментов, сравнивать их с вновь генерированными профилями из других проб. Система позволяет идентифицировать редко встречающиеся различия.

Как уже было указано в разделе «Возбудитель антракса», М.Hugh-Jones (1997) представил результаты изучения 85 изолятов. Был получен образец фрагмента, специфичный для каждого анализируемого штамма *Bac.anthraxis*. 80 изолятов отнесли к *Bac.anthraxis*. Все они, за исключением одного, были очень похожи друг на друга. Отмечены незначительные штаммоспецифические различия. При дальнейшем анализе единственный отличающийся изолят был определен как штамм *Bac.cereus*.

Эти результаты подтвердили мнение о том, что в отличие от многих бактериальных патогенов *Bac.anthraxis* является весьма мономорфным в организации своего генома с очень малыми генетическими отличиями среди штаммов. Среди разных изолятов *Bac.anthraxis* имелись только слабые различия. Но профили других близкородственных видов бацилл отчетливо отличаются от таковых *Bac.anthraxis*.

ПДАФ анализ позволяет не только дифференцировать штаммы на уровне видов *Bacillus*, но также определять штаммы по вирулентности.

Установлены фрагменты, генерируемые плазмидами и хромосомой. Соответственно по их наличию или отсутствию определены штаммы как вирулентные и авирулентные. При сравнении фрагментов ДНК из штаммов близкородственных видов (*Bac.cereus*, *Bac.thuringiensis*, *Bac.mycoides*, *Bac.polymyxa*, *Bac.subtilis*, *Bac.stearothermophilus*) каждый вид давал уникальный образец. Между штаммами *Bac.anthraxis* существовали небольшие различия.

Был визуализирован 1221 фрагмент в ПДАФ профилях. Из них 1184 (97%) были идентичными у всех штаммов; напротив, почти 60% фрагментов менялись между *Bac.anthraxis* и его ближайшими «родственниками». Существовал 31 фрагмент, которые были полиморфны для разных штаммов *Bac.anthraxis*, что позволяло построить филогенетическое древо и проследить эволюцию штамма.

Сходные результаты получили при использовании двух разных компьютерных программ. При идентификации видов *Bacillus* неизвестного изолята ПДАФ анализ его ДНК позволял поместить изолят в определенное место филогенетического древа и провести индикацию вида, а возможно, и анализируемого штамма. Для *Bac.anthraxis* подобный филогенетический анализ был сделан при изучении переменных фрагментов.

Изоляты в американской коллекции были разделены на 2 группы — А и В, происходящие из Африки. Штаммы, выделенные в Северной Америке, Европе и на Ближнем Востоке, определены как субсеты этих групп. Эти две группы могут представлять два независимых эпидемических очага, из которых отдельные изоляты распространились по Африке и другим континентам.

Многие изоляты, выделенные в Канаде и США на протяжении 25 лет от разных видов животных, в разных местах, отдаленных друг от друга на расстояние более 1000 км, были очень похожи. Подобная тесная генетическая похожесть предполагает, что эта эпизоотия является результатом единичного заноса, а *Bac.anthraxis* очень мало меняется по мере ее распространения.

Четыре изолята из Калифорнии были очень похожи на канадские варианты, что согласуется с теорией общего происхождения вспышки в Канаде и центральной части США. Эти результаты позволяют высказать предположение, что параметры изолятов, определяемые ПДАФ маркерами, достаточно устойчивы в течение длительного периода времени, необходимого для того, чтобы проследить за развитием эпидемии (эпизоотии).

Отличающиеся результаты получены при изучении изолятов, выделенных от домашних животных в Норвегии. Эти изоляты были в значительной степени несхожими, что может свидетельствовать о неоднократном, не связанном друг с другом заносе спор сибирской язвы, возможно, с товарами народного потребления, а не с эпидемией, возникшей в результате одного заноса.

Большие возможности ПДАФ анализа были убедительно продемонстрированы при проведении экспертиз с некоторыми штаммами. Была поставлена задача оценить сибиреязвенную вакцину, применяемую в Непале, которая вызывала заболевание некоторых привитых животных и их гибель. Был проведен ПДАФ анализ с ДНК из трех видов колоний, высеянных из этой вакцины. Установлено, что вакцина представляет собой живой аттенуированный штамм *Bac.anthraxis*, контаминированный небольшим количеством вирулентных клеток *Bac.anthraxis*, другой контаминант определен как *Staphylococcus*, возможно, *S.aureus*. Понятно, что использование этой вакцины недопустимо.

Посредством ПДАФ анализа был охарактеризован изолят *Bac.anthraxis*, первоначально неправильно идентифицированный как *Bac.megaterium*. Этот штамм был апатогенен и обладал b-гемолизом. Используя ПЦР анализ, обнаружили плазмиды pX01 и pX02, что свидетельствовало о присутствии в изоляте *Bac.anthraxis*.

Кроме того, при сравнении ПДАФ профилей этих двух видов были получены четкие результаты в отношении *Bac.anthraxis*. Анализ 16S рибосомального региона хромосомы также подтвердил результаты ПДАФ анализа. В то же время последовательность мнимого *Bac.megaterium* не соответствовала той же последовательности от известных штаммов *Bac.megaterium*, но точно соответствовала той же последовательности *Bac.anthraxis*.

С помощью автоматизированной системы анализа профилей ПДАФ был идентифицирован изолят *Bac.anthraxis* с нетипичными свойствами, первоначально неправильно определенный как *Bac.thuringiensis*. Изолят не содержал ни одной из двух плазмид (ни pX01, ни pX02), несколько хромосомных локусов ДНК были

153
также разными. П
такими *Bac.thu*
многими изолята
С использо
ка сибирской язв
что эта вспышка
ков с захоронени
го крупного рога
Анализ показал, ч
вали 42 пробы от
Такой результат
ника.

Установлено т
тичны двум архи
лекции и выделе
году был импорт
ждает, что вспы
известно также,
место повторный
возможно, при т

Представленн
определения хар
ции от сходных
Недостаткам
очищенной ДНК
можность его пр
жающей среды.

Был разрабо
ширенного анали
ускоренный анали
и др.

Обнаружена
по длине у разл
зовании этой п
которые амплиф
из сложной про
Vega обнаружен
известные изоля
ющихся по числ
ной 12 п.о. Эти т
емых последова

также разными. ПДАФ профили этого изолята не имели сходства с таковыми *Bac.thuringiensis*, но были похожи (но не идентичны) со многими изолятами *Bac.anthraxis*.

С использованием ПДАФ анализа была расшифрована вспышка сибирской язвы в Австралии в 1997 году. Существовало мнение, что эта вспышка могла быть вызвана нарушением скотомогильников с захоронениями импортированного из Индии инфицированного крупного рогатого скота, павшего от этой болезни в 1840 году. Анализ показал, что все австралийские изоляты 1997 года (исследовали 42 пробы от 28 животных) были одним и тем же штаммом. Такой результат предполагает, что вспышка была от одного источника.

Установлено также, что австралийские изоляты были почти идентичны двум архивным изолятам *Bac.anthraxis*, хранившимся в коллекции и выделенным в той же местности Индии, откуда в 1840 году был импортирован скот в Австралию. Однако автор не утверждает, что вспышка вызвана именно нарушением могильника. Неизвестно также, персистировали ли споры с 1840 года, или мог иметь место повторный занос одного и того же изолята сибирской язвы, возможно, при торговле компонентами корма для скота.

Представленные результаты показывают большие возможности определения характера штамма, его происхождения, дифференциации от сходных видов бацилл с помощью ПДАФ анализа.

Недостатками метода являются необходимость использования очищенной ДНК, изолированной хотя бы из одной колонии, и невозможность его применения при прямом исследовании проб из окружающей среды.

Был разработан метод, который не требовал чистой ДНК и расширенного анализа ПДАФ профилей. С его помощью возможен ускоренный анализ ДНК из проб тканей, крови, окружающей среды и др.

Обнаружена область последовательности ДНК, изменяющаяся по длине у различных изолятов возбудителя антракса. При использовании этой последовательности были созданы ПЦР праймеры, которые амплифицировали переменную ДНК последовательность из сложной пробы, содержащей ДНК из многих источников. В гене *Vega* обнаружен и хорошо изучен локус, который разрывает все известные изоляты *Bac.anthraxis* на 5 полиморфных типов, отличающихся по числу tandemных переменных повторов (ТВП) длиной 12 п.о. Эти типы идентифицируются числом tandemно повторяемых последовательностей. Все известные изоляты *Bac.anthraxis*

содержат от 2 до 6 копий в повторе. Установлена четкая корреляция между полиморфными типами и географическим распространением изолятов возбудителя сибирской язвы (Табл. 25).

Таблица 25.
Географическое происхождение разных изолятов
Bac.anthraxis (по M.Hugh-Jones, 1997)

Географический регион	Типы повторов				
	ТВП ₂	ТВП ₃	ТВП ₄	ТВП ₅	ТВП ₆
Аргентина	0	0	0	1	0
Азия ¹	0	1	6	2	0
Британские острова ²	5	5	7	2	1
Европа ³	2	6	12	2	0
Ближний Восток ⁴	0	1	11	0	0
Северная Америка, Карибские острова ⁵	1	6	46	2	1
Норвегия	0	2	2	1	0
Южная Африка ⁶	3	15	30	1	20
Неизвестные	0	0	4	0	0
ИТОГО:	11(5,6%)	36(18,1%)	118(59,6%)	11(5,6%)	22(11,1%)

Примечание: 1. Индонезия и Южная Корея;

2. Англия, Ирландия и Шотландия;

3. Франция, Германия, Италия, Словакия и Швейцария;

4. Ливан, Пакистан и Турция;

5. Канада, Ямайка (2 культуры) и США;

6. Мозамбик, Намибия, Замбия и Зимбабве.

При анализе числа копий тандемных повторов у 198 изолятов *Bac.anthraxis* было показано, что ТВП₄ являлся наиболее часто встречающимся типом. 118 (59,6%) проверенных изолятов, включая вакцинные штаммы Sterne, Ames и Vollum, относились к этому типу; 36 изолятов (18,1%) относились к типу ТВП₃ и 22 (11,1%) были ТВП₆ типа. ТВП₂ был представлен 11 (5,6%), также и ТВП₅ – 11 (5,6%)

Проанализировано происхождение различных изолятов возбудителя сибирской язвы. Установлено, что из 22 членов полиморфного типа ТВП₆ 20 и 15 из 36 ТВП₃ распространены в Южной Африке или прилегающих странах, что свидетельствует об общем происхождении изолятов возбудителя в этом месте. Почти половина типа 2 (5 из 11) имеют происхождение на Британских островах. 46 изолятов полиморфного типа ТВП₄ были выделены в Северной Америке.

Автор считает, что если увеличить число маркеров в анализе и если будут картированы другие изменчивые локусы, то можно получить такую же информацию о штаммах *Bac.anthraxis*, какая может быть получена после полного ПДАФ анализа ДНК, выделенной из чистой культуры.

В настоящее время
изменчивых локусов
соматических маркеров
использоваться в
какая система позво
провести быстру
(A.Klevytska et al.)
эти праймеры про
было обнаружить
пробах *Bac.anthraxis*
делить штамм, пр
и вакцинам.

С удовлетворением
ученых, выполни
кулярно-биологи
весомый вклад, с

Сконструирован
ные штаммы воз
других представи
сономических гр

Авторы опреде
вательности в со
ли на их основе

рХ01 локализова
ющие репликон
рестриктазой *H*
E.coli на вектор

Bam HI/Hind III
ной плазмиды pZ
гибридизации с т
пользоваться в к
да.

Для упрощения
бирезазвенных ш
позволяющий бл
кий сибирезазве

чать ДНК-зонд
достройки прай
кий, 1995).

Манипулиру
на основе ДНК

В настоящее время разработаны ПЦР праймеры для нескольких изменчивых локусов. Разработано 8 высокоинформативных хромосомальных маркеров и 2 плазмидных маркера. Эти маркеры могут использоваться в ПЦР анализах одиночно или в комбинации. Такая система позволяет проводить реакции с неочищенной ДНК и провести быструю оценку многих изолятов из очага антракса (А.Клевытска et al., 1998). Предполагается в дальнейшем снабдить эти праймеры простым набором для экстракции, для того чтобы можно было обнаружить, даже в небольших лабораториях, присутствие в пробах *Bac.anthraxis* и в течение короткого периода времени определить штамм, присутствие плазмид, резистентность к антибиотикам и вакцинам.

С удовлетворением отмечаем большое число работ отечественных ученых, выполненных с использованием всех новейших молекулярно-биологических методов, высокий уровень исследований и весомый вклад, сделанный нашими соотечественниками.

Сконструирован ДНК-зонд, который идентифицирует токсигенные штаммы возбудителя сибирской язвы, дифференцируя их от других представителей рода *Bacillus* и микроорганизмов иных таксономических групп (В.Б.Тимошин и др., 1994).

Авторы определили видоспецифические нуклеотидные последовательности в составе репликона плазмиды рХ01 и сконструировали на их основе диагностический ДНК-зонд. На плазмидной ДНК рХ01 локализованы два *Bam* HI-фрагмента, специфически выявляющие репликон рХ01. Эти фрагменты после полного гидролиза рестриктазой *Hind* III клонированы методом «шотган» в клетках *E.coli* на векторных плаزمиде рUC 19 и рBR 322. Показано, что *Bam* HI/*Hind* III-фрагмент размером 900 м.п.н. из рекомбинантной плазмиды рZAT1 обладает способностью к специфической ДНК-гибридизации с токсигенными штаммами *Bac.anthraxis* и может использоваться в качестве видоспецифического сибиреязвенного зонда.

Для упрощения процедуры проведения ДНК-зондирования сибиреязвенных штаммов сконструирован рекомбинантный фаг fZAT6, позволяющий быстро и эффективно накапливать видоспецифический сибиреязвенный ДНК-зонд в одноцепочечной форме и получать ДНК-зонды с высокой удельной радиоактивностью методом достройки праймеров (В.Б.Тимошин, В.С.Замараев, А.В.Липницкий, 1995).

Манипулируя разными методами праймерного синтеза зондов на основе ДНК фага fZAT6, авторы получили ДНК-зонды разной

специфичности и, следовательно, для разных целей. Показано, что ДНК-зонд fZAT6-H, получаемый техникой достройки гибридационного праймера, позволяет дифференцировать возбудителя сибирской язвы от других представителей рода *Bacillus*, а ДНК-зонд fZAT6-S, получаемый техникой достройки секвенационного праймера, позволяет идентифицировать штаммы возбудителя сибирской язвы, несущие плазмиду pX01.

Отработанный авторами методический подход праймерного синтеза сибиреязвенного ДНК-зонда с высокой удельной радиоактивностью на базе одноцепочечной ДНК фага fZAT6, в отличие от нуклеотидно-транслированных зондов, получаемых на основе плазмиды pZAT1, позволяет учитывать результаты автордиографии уже через 4 часа, а вся процедура проведения ДНК-зондирования сибиреязвенных штаммов не превышает 18 часов.

А.Г.Агбарян, Е.И.Еременко, Н.В.Саркисова (1998) испытали праймеры к хромосомальной последовательности Ва 813 и последовательностям плазмидных генов *rag* и *sar* В для индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы. Положительные результаты с праймерами к плазмидным генам получены со штаммами, содержащими соответствующие плазмиды, а также материалом, содержащим возбудителя сибирской язвы, что было подтверждено его выделением. ПЦР с праймерами к хромосомальной последовательности Ва 813 также дала положительные результаты со всеми штаммами и некоторыми пробами подозрительного материала, включая те, из которых возбудитель сибирской язвы не был выделен. Возможно, некоторые из них являются ложноположительными. Подобные результаты были получены и другими авторами. Вероятной причиной могут быть различия в нуклеотидных последовательностях фрагментов амплификации у близкородственных бацилл из объектов внешней среды и *Bac.anthraxis* при электрофоретически одинаковых размерах. Для решения вопроса о пригодности таких праймеров к индикации необходимо изучение чистых культур большего числа близкородственных бацилл с рестрикционным и гибридационным анализом получаемых амплификатов.

Н.М.Гришкевич, Т.Х.Файзов (1998) сконструировали на основе плазмиды pX02 комплементарные праймеры длиной 20 пар нуклеотидов. ПЦР с данной парой праймеров позволила обнаруживать сибиреязвенную палочку в искусственно контаминированных объектах ветеринарно-санитарного надзора (вода, зерно, почва и др.) с чувствительностью до 10 микробных клеток (спор) на 1 г пробы

157
Л.Я.Цыбань
тарные нуклео
дителя сибирск
водила к синте
гибридизирова
мент гена про
ных бацилл на
звоял обнару
ных штаммом
ции 100 клеток
меров метод П
ток в пробе.
Проведень
мов возбудите
за, геномной д
1999). Исслед
существующими
отдельных шт
ференциации
Методами
также получе
терогенности
Зубаирова, Л.
А.М.Али
бирской язвы
Несмотря
щью ПЦР м
результаты п
На основе
ружить спор
часов. В кач
тидные посл
Сар В белк
1992).
Чувствит
мы для ана
мов pX01*,
дов *Bacillus*
чена Л.Саяп
Обнаруж
щих 10 клето

Л.Я.Цыбанова и др. (1999) испытывали праймеры, комплементарные нуклеотидным последовательностям генов токсина возбудителя сибирской язвы. Постановка ПЦР с этими праймерами приводила к синтезу фрагментов размерами 1800 и 580 п.о., которые гибридизировались с рекомбинантной плазмидой, содержащей фрагмент гена протективного антигена. Амплификация ДНК непатогенных бацилл не обнаружена. Используемый авторами метод позволял обнаруживать в образцах органов морских свинок, зараженных штаммом М-71, ДНК возбудителя сибирской язвы в концентрации 100 клеток, а при использовании гнездовых «внутренних» праймеров метод ПЦР позволял определять до 10 бактериальных клеток в пробе.

Проведены исследования по дифференциации вакцинных штаммов возбудителя сибирской язвы методами рестрикционного анализа, геномной дактилоскопии и ПЦР (И.Ф.Вишняков, С.Ж.Цыбанов, 1999). Исследованные штаммы наряду с общими фрагментами, присутствующими в ДНК, имели также фрагменты, специфичные для отдельных штаммов, что позволяло оценить ПЦР анализ для дифференциации штаммов.

Методами рестрикционного анализа и геномной дактилоскопии также получены результаты, свидетельствующие о структурной гетерогенности хромосомной ДНК сибиреязвенных штаммов (П.Ю.Зубаирова, Л.Я.Цыбанова, В.А.Гаврилов, С.Ж.Цыбанов, 1997).

А.М.Алимов и др. (1998) идентифицировали возбудителя сибирской язвы по штаммовой принадлежности.

Несмотря на то, что, как принято считать, теоретически с помощью ПЦР можно обнаружить в пробе один геном, практические результаты пока выглядят скромнее.

На основе ПЦР разработан метод детекции, позволяющий обнаружить споры *Bac.anthraxis* в количестве 10-100 КОЕ в течение 6-7 часов. В качестве олигонуклеотидных праймеров выбраны нуклеотидные последовательности локуса, детерминирующего продукцию Сар В белка плазмиды рХ02 (И.В.Тучков, А.И.Куличенко и др., 1992).

Чувствительность и специфичность диагностической тест-системы для анализа рХ01⁺ *Bac.anthraxis* посредством ПЦР для 20 штаммов рХ01⁺, 9 штаммов рХ01⁻ *Bac.anthraxis* и 15 штаммов других видов *Bacillus* (*cereus*, *subtilis*, *megaterium*, *thuringiensis*) была изучена Л.Саяпиной и др. (1998), (L.Sayapina et al., 1998).

Обнаружили штамм рХ01⁺ *Bac.anthraxis* в 4 из 9 проб, содержащих 10 клеток в 0,5 мл, в 8 из 10 проб, содержащих 10² клеток, и в 18

из 20 проб, содержащих 10^3 клеток. Не зарегистрировано положительных реакций при испытании 15 штаммов других видов *Bacillus* в концентрации 10^7 клеток в пробе. Следовательно, диагностическая тест-система обеспечивала высокую чувствительность и специфичность.

При изложении материала в данной главе «Диагностика ...» мы не выделили отдельно раздел «Индикация», считая, что последний является составной частью диагностических процедур и в данной книге такое разделение нецелесообразно. Отметим некоторые проблемы.

Значительные трудности возникают при индикации возбудителя сибирской язвы в объектах внешней среды и кормах, связанные с наличием в них большого количества сапрофитных спорообразующих бацилл, которые, как уже указывали, имеют родство с сибиреязвенным микробом. Подращивание на питательных средах проб, полученных из объектов внешней среды, не приводит к накоплению возбудителя сибирской язвы, так как микробы-антагонисты частично или полностью подавляют рост сибиреязвенного микроба.

Большинство работ в этом направлении проведено с использованием ПЦР.

M. Carl et al. (1992) продемонстрировали возможность использования ПЦР при анализе препаратов, содержащих споры *Bac. anthracis*. Однако они полагали, что обнаруживаемая в препаратах спор ДНК скорее имеет экзогенное происхождение из вегетативных клеток, лизированных до споруляции, чем непосредственно из самих спор.

M. Johns et al. (1994) провели более углубленные исследования и показали высокую чувствительность и специфичность ПЦР с ДНК спор. Использовали споры необработанные, проросшие и разрушенные механическим путем. Положительные результаты в необработанных препаратах соответствовали обнаружению 10^4 жизнеспособных спор. Авторы также считают, что амплификация происходит с экзогенной ДНК в качестве мишени, а споры не освобождают достаточного количества ДНК для ПЦР. Прорастание спор увеличивало чувствительность теста, позволяющего обнаружить 10 спор на тест. Эквивалентная чувствительность в ПЦР обнаружена у проросших спор (процесс прорастания/лизиса – 4-5 часов) и спор при механическом разрушении их в течение 10 минут.

Установлено, что при анализе проб почвы и других образцов, содержащих ингибиторы, предварительно до проведения ПЦР необходимо провести их интенсивную обработку для удаления ингибиторов (P. Wilkstrom et al., цит. по A. Siostedt, 1996).

По данным A.Siostedt et al. (1996), в экспериментах по обнаружению вегетативных форм *Bac.anthraxis* в почве установлено, что после добавления клеток микроба специфическая ДНК могла быть экстрагирована и амплифицирована методом ПЦР. Детекция в разных горизонтах почвы составляла 3×10^1 и 3×10^3 бактерий/мг почвы.

В Великобритании шерсть и кашемир, ввезенные из стран с высоким риском заболевания сибирской язвой, исследуют на контаминацию спорами антракса обычными микробиологическими методами, которые не совсем устраивают импортеров, поскольку требуют длительного времени и, следовательно, дорогостоящи.

Применительно к этому объекту был испытан метод ПЦР (K.Levi et al., 1998). Сибиреязвенные споры вымывали из случайно отобранных проб шерсти и кашемира, подвергали механическому разрушению для экстракции ДНК и проведения ПЦР. Были амплифицированы 2 региона: один на хромосоме, специфичной для всех штаммов *Bac.anthraxis* (по данным G.Patra et al., 1996); другой — на плазмиде pX02, что показывает присутствие вирулентных микробов (N.Vietri et al., 1995).

J.Ezzel, T.Abshire (1996) для идентификации спор *Bac.anthraxis* использовали фенотипические методы. Споры инкубировали 30-45 минут в двух средах, а затем окрашивали мечеными флуоресцеинизотионатом моноклональными антителами к капсулярной поли-Д-глутаминовой кислоте и к клеточной стенке, ассоциированной с галактозо/N-ацетилглюкозамин полисахаридом. Несмотря на то, что другие виды *Bacillus* (некоторые штаммы *Bac.subtilis* и *Bac.licheniformis*) и два штамма *Bac.cereus* продуцируют галактозо/N-ацетилглюкозамин полисахарид, комбинация обоих методов позволяет достоверно определить *Bac.anthraxis*. Специфичность полисахарида для *Bac.anthraxis* продемонстрирована.

Оценивая многочисленные методы лабораторной диагностики сибирской язвы животных, считаем, что в практической деятельности основной метод диагностики останется традиционным — микроскопия мазков из патологического материала, заражение лабораторных животных, постановка реакции преципитации по Асколи (при исследовании кожевенного сырья или несвежего, загнившего патологического материала). Другие серологические реакции не получили практического применения, например, реакция агглютинации из-за ее неспецифичности. Не нашла также применения реакция связывания комплемента (РСК) для выявления антител в сыворотках вакцинированных животных. Большинство иммунных

сывороток были либо отрицательными в РСК, либо их титры не соответствовали фактической защищенности организма.

Для идентификации возбудителя сибирской язвы следует изучить:

- морфологию микроба, включая наличие капсул в мазках из исходного патологического материала или органов павших подопытных животных;
- культуральные свойства;
- патогенность для лабораторных животных.

В случае получения нечетких результатов по одному из двух первых свойств, не дожидаясь результатов биопробы, следует определить чувствительность культуры к сибиреязвенному бактериофагу и пенициллину.

Широкое использование методов молекулярной биологии и генетики для идентификации возбудителя сибирской язвы и дифференциации родственных микроорганизмов ветеринарными лабораториями, в том числе и республиканскими, на современном этапе представляется маловероятным.

Генотипические методы, связанные с анализом генома возбудителя, по нашему мнению, будут использоваться в основном как инструмент в научно-исследовательской работе, а также для проведения более углубленной эпизоотологической оценки, выявления различий циркулирующих штаммов, определения путей заноса возбудителя, эволюции микроба, дифференциации *Bac.anthraxis* от других родственных бацилл.

Для практических работников не вызывает затруднений идентификация вирулентных капсульных штаммов. Как показали исследования, эти штаммы однотипны независимо от источников выделения, характеризуются лишь небольшими отличиями. Проблему представляют идентификация полевых бескапсульных штаммов *Bac.anthraxis*, обладающих слабой вирулентностью для мышей, морских свинок, а также дифференциация их от *Bac.cereus*, патогенных для людей и лабораторных животных.

По этим вопросам, как свидетельствуют данные отечественных и зарубежных ученых, впечатляющие результаты получают при использовании новых методов молекулярной биологии — ПЦР, геномной дактилоскопии, рестрикционного анализа.

Следует обратить внимание на стратегию ученых США из Национальной лаборатории в Лос-Аламосе и других учреждений. Они предполагают снабдить практические лаборатории, в том числе небольшие, разработанными ими праймерами и другими необходимыми

161
ми компонентами для генотипирования выделенных штаммов.
Для практики нашей страны — первичный диагностический метод — классическими микробиологическими методами, особенно в подавляющем большинстве случаев, принадлежность возбудителя к сибирской язве необходимо подтвердить по чувствительности ПЦР к чувствительности ДНК до 10³ копий (результаты с образцами по 10³ копий). В то же время ма- ных методов для выделения составляет приблизительно 10³ копий (P. Turnbull, 1996).

ми компонентами для генотипирования в короткий срок в полевых условиях выделенных штаммов и быстрой расшифровки эпизоотии.

Для практики нашей страны это пока недостижимо. Наша позиция — первичный диагноз следует проводить всеми доступными классическими микробиологическими методами, позволяющими уверенно в подавляющем большинстве случаев определить видовую принадлежность возбудителя, не преувеличивая значение новых методов.

Необходимо обратить внимание на сообщаемые разные данные по чувствительности ПЦР: теоретически от одного генома (с высокоочищенной ДНК) до 10^3 - 10^4 клеток в пробе (практические результаты с образцами почвы и другими пробами из окружающей среды). В то же время максимальная чувствительность традиционных методов для выделения *Bac. anthracis* из проб окружающей среды составляет приблизительно 5 спор на грамм (J. Bowen, I. Henderson, P. Turnbull, 1996).

6. НОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА) У ЖИВОТНЫХ И ЛЮДЕЙ

Не много нового найдет читатель в современной литературе по проблеме лечения сибирской язвы (антракса) у животных. Как это ни печально, но ветеринарные специалисты чаще всего встречаются с сибирской язвой у животных в терминальной стадии болезни, а еще чаще с погибшими животными. В первом случае есть опасность столкнуться с вынужденно убитым больным животным, во втором — начать вскрытие трупа нераспознанного сибиреязвенного животного, что категорически противопоказано.

Все это происходит потому, что болезнь у животных, как правило, скоротечна, а клинические признаки не столь патогномичны, чтобы по ним поставить прижизненный диагноз. Внешний осмотр трупа не всегда дает основания заподозрить сибирскую язву.

Но если уж удалось точно распознать при жизни сибирскую язву, то своевременное лечение может спасти животное.

В соответствии с санитарными и ветеринарными правилами «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных» (1996) в эпизоотическом очаге сибирской язвы ветеринарный специалист проводит клинический осмотр и термометрию всего поголовья скота, кроме свиней, которых исследуют кожно-аллергической пробой с сибиреязвенным аллергеном. По результатам исследования животных делят на две группы. В первую группу входят животные, имеющие клинические признаки болезни или повышенную температуру тела, а также свиньи, положительно реагировавшие на введенный аллерген. Этих животных подвергают лечению. Через 14 дней после клинического выздоровления им прививают противосибиреязвенную вакцину. Во вторую группу входят остальные животные, находящиеся в эпизоотическом очаге. Животных этой группы вакцинируют с последующим (в течение трех дней) ежедневным клиническим осмотром и измерением температуры тела. Животных с клиническими признаками сибирской язвы и повышенной температурой переводят в первую группу.

Для лечения животных применяют гипериммунную противосибиреязвенную сыворотку, специфический гамма-глобулин и антибиотики.

Противосибиреязвенную сыворотку применяют не только с лечебной, но также и с профилактической целями. Ее вводят, как правило, подкожно в дозах, указанных в табл. 26.

163		Вид животных
		Лошади и верблюды
		Крупный рогатый скот
		Овцы, козы, телята, свиньи
		В тяжелых случаях
		крупному рогатому скоту
		ямки. Перед введением
		бане до 37-38°C. Во
		дугается сыворотку вна
		чего через 15-30 мин
		часов температура тел
		воротку вводят повто
		пассивный иммунитет
		Лечебная эффекти
		чем эффективность сы
		Противосибиреязв
		фракций, выделенных
		сыворотки. Применяю
		целями подкожно в до
		Вид животных
		Лошади и верблюды
		Взрослый крупный ро
		скот и олени
		Овцы, козы, телята и св
		Вводят его так же,
		витых животных им
		Применение гипер
		ки или гамма-глобул
		тибиотиков.
		Для медицинских
		саров, Е.В. Белов

Таблица 26.

Вид животных	Предохранительная доза, мл	Лечебная доза, мл
Лошади и верблюды	15 – 20	100 – 200
Крупный рогатый скот	15 – 20	100 – 200
Овцы, козы, телята, свиньи	8 – 10	50 – 100

В тяжелых случаях сыворотку можно вводить внутривенно, а крупному рогатому скоту – внутрибрюшинно в область голодной ямки. Перед введением сыворотку необходимо прогреть на водяной бане до 37-38°C. Во избежание анафилактического шока рекомендуется сыворотку вначале ввести подкожно в дозе 0,5-1,0 мл, после чего через 15-30 мин ввести остальное количество. Если через 5-6 часов температура тела у больного животного не снижается, то сыворотку вводят повторно. У животных, привитых сывороткой, пассивный иммунитет сохраняется до 14 дней.

Лечебная эффективность гамма-глобулина значительно выше чем эффективность сыворотки.

Противосибиреязвенный глобулин – это комплекс белковых фракций, выделенных из гипериммунной противосибиреязвенной сыворотки. Применяют его также с лечебной и профилактической целями подкожно в дозах, указанных в табл. 27.

Таблица 27.

Вид животных	Профилактическая доза, мл	Лечебная доза, мл
Лошади и верблюды	6,0 – 7,5	40 – 80
Взрослый крупный рогатый скот и олени	6,0 – 7,5	40 – 80
Овцы, козы, телята и свиньи	3 – 4	20 – 40

Вводят его так же, как противосибиреязвенную сыворотку, у привитых животных иммунитет сохраняется до 14 дней.

Применение гипериммунной противосибиреязвенной сыворотки или гамма-глобулина рекомендуется сочетать с инъекциями антибиотиков.

Для медицинских целей группой исследователей (А.В.Комиссаров, Е.В.Белова, Ю.С.Жучихин и др., 1998) получен противоси-

биреязвенный глобулин лошадиный жидкий. Перед специалистами, занимающимися вопросами практического применения глобулина, встала задача по отработке условий его хранения и транспортирования. Результаты исследований показали, что противосибиреязвенный глобулин сохраняет свои свойства в том случае, если находится (транспортируется) при температуре 25°C не более 20 суток. После этого он может быть использован в противоэпидемической практике.

Эти же авторы получили сухую форму полуфабриката глобулина. При конструировании состава среды высушивания полуфабриката глобулина они взяли за основу среду СП (7,5% сахарозы и 1,5% поливинилпироллидона), заменив при этом поливинилпироллидон на полиглюкин, являющийся заменителем крови, оставив таким же его процентное содержание. Сухая форма полуфабриката глобулина позволит увеличить время его хранения до переработки.

В.М.Козинниковой, И.А.Бакуловым, В.А.Гавриловым (1988) во ВНИИВВиМ разработана и предложена схема комплексного применения антибиотиков при лечении сибирской язвы разных видов животных. Опыты, проведенные на естественно восприимчивых животных, показали высокую эффективность предложенной схемы, позволяющей при своевременном применении добиться 100-процентного выздоровления заболевших животных и, что очень важно, полного освобождения их организма от возбудителя сибирской язвы.

Комбинированная антибиотикотерапия применяется в эпизоотическом очаге для профилактики и лечения сибирской язвы у сельскохозяйственных животных.

Комбинированное использование антибиотиков с различным механизмом действия препятствует образованию в организме устойчивых форм возбудителя сибирской язвы, позволяет уменьшить дозы входящих в сочетания антибиотиков, что способствует более эффективному использованию имеющихся антибиотиков, снижению токсичности и материальных затрат.

Антибиотики (тетрациклин, стрептомицин, эритромицин, ампициллин), входящие в сочетания, применяют при заболевании животных сибирской язвой и вводят в половинной суточной дозе, установленной для каждого вида животных согласно действующим методическим указаниям по применению антибиотиков в ветеринарии. В табл. 28 приведены схемы применения антибиотиков в рекомендуемых сочетаниях и дозах.

Ампициллина натриевую соль необходимо вначале растворить в мл 0,5-процентного раствора новокаина, а затем довести до нуж-

№ схемы	Сочетание антибиотиков	Взрослым	
		Однократно	Повторно
1.	Тетрациклин + стрептомицин	10,0	3,0
2.	Тетрациклин + ампициллин	10,0	6,0
3.	Тетрациклин + эритромицин	10,0	4,0

Примечание: С...
ном растворе з...
часов на 0,5-пр...

ного объема 0,5-п...
гидрохлорид, стре...
ряют в необходим...
экмолина.

Все сочетания...
применением. Нес...
антибиотиков пооч...
ние вводят внутри...
сочетание эритро...
ный раствор желт...
тую равномерную...
Сочетания ант...
лин+эритромицин...
ния и профилак...
вотных в период...
ко с лечебной це...
заболеванию жи...
предупрежден...

Таблица 28.

Схемы комплексного применения антибиотиков
при лечении сибирской язвы у разных видов животных

№ схемы	Сочетания антибиотиков	Крупный рогатый скот				Мелкий рогатый скот				Свиньи				Кролики			
		Взрослые		молодняк до 6 мес.		взрослые		молодняк до 4 мес.		взрослые		молодняк до 4 мес.		всех возрастов			
		Суточная доза антибиотиков (в тыс. ед. на 1 кг живой массы)														(в тыс. ед. на 1 жив.)	
		Однократно	Двакратно	Однократно	Двакратно	Однократно	Двакратно	Однократно	Двакратно	Однократно	Двакратно	Однократно	Двакратно	Однократно	Двакратно		
1.	Тетрациклин + стрептомицин	10,0	5,0	20,0	10,0	7,0	3,5	30,0	15,0	15,0	7,0	25,0	12,5	30,0	15,0		
		3,0	1,5	5,0	2,5	10,0	5,0	20,0	10,0	10,0	5,0	20,0	10,0	30,0	15,0		
2.	Тетрациклин + ампициллин	10,0	5,0	20,0	10,0	7,0	3,5	30,0	15,0	15,0	7,5	25,0	12,5	30,0	15,0		
		6,0	3,0	10,0	5,0	8,0	4,0	20,0	10,0	12,0	6,0	16,0	8,0	60,0	30,0		
3.	Тетрациклин + эритромицин	10,0	5,0	20,0	10,0	7,0	3,5	30,0	15,0	15,0	7,5	25,0	12,5	30,0	15,0		
		4,0	2,0	6,0	3,0	8,0	4,0	12,0	6,0	6,0	3,0	8,0	4,0	30,0	15,0		

Примечание: Однократно – один раз в сутки на пролонгаторе (0,5-процентном растворе экмолина); двукратно – два раза в сутки с интервалом 8-12 часов на 0,5-процентном растворе новокаина.

ного объема 0,5-процентным раствором экмолина. Тетрациклина гидрохлорид, стрептомицина сульфат, эритромицина фосфат растворяют в необходимом для работы объеме 0,5-процентного раствора экмолина.

Все сочетания антибиотиков готовят непосредственно перед их применением. Необходимую дозу предварительно растворенных антибиотиков поочередно набирают в шприц и полученное сочетание вводят внутримышечно. Необходимо иметь в виду, что только сочетание эритромицина с тетрациклином представляет прозрачный раствор желтого цвета, другие сочетания – желтовато-беловатую равномерную суспензию.

Сочетания антибиотиков: тетрациклин+стрептомицин, тетрациклин+эритромицин, тетрациклин+ампициллин используют для лечения и профилактики сибирской язвы у сельскохозяйственных животных в период вспышки болезни. Их следует применять не только с лечебной целью для лечения больных и подозрительных по заболеванию животных, а также с профилактической целью для предупреждения заражения слабых, истощенных и находящихся на

последних месяцах беременности животных, молодняка до трех месяцев (т.е. животных, которых в данный момент нельзя вакцинировать).

Для лечения животных, больных и подозрительных по заболеванию сибирской язвой, сочетания антибиотиков применяют в течение 7-10 дней исходя из показателей состояния их здоровья. Таких животных в обязательном порядке изолируют в помещении, обеспечивающем проведение общих ветеринарно-санитарных мероприятий.

С профилактической целью сочетания антибиотиков необходимо применять в течение 5-7 дней. Их вводят так же, как и при лечении животных.

Лечение сочетаниями антибиотиков необходимо начинать как можно раньше и строго выдерживать курс лечения.

После прекращения заболевания всех животных, обработанных антибиотиками, вакцинируют в порядке, предусмотренном действующим наставлением по применению вакцин против сибирской язвы у сельскохозяйственных животных.

Заслуживает внимания сообщение M.Jones, R.Beedham, P.Turnbull и R.Manchee (1996), посвященное профилактике ингаляционного антракса с помощью антибиотиков. Опыты были проведены на морских свинках, которым вводили ципрофлоксин и доксициклин. Оказалось, что эти антибиотики защищали морских свинок от гибели при контрольном заражении большими дозами возбудителя — 10^6 спор штаммов Ames или Vollum. Применение антибиотиков прекращали через 21 день после контрольного заражения.

Все контрольные, нелеченные животные погибли в течение 72 часов. Специфичность гибели подтверждена исследованием мазков-отпечатков крови.

Ни одно животное, получавшее антибиотики, не погибло в течение 21 дня. После отмены антибиотиков погибли 3 из группы леченных ципрофлоксином и 4 из группы леченных доксициклином. У павших животных в легких, селезенке и печени обнаружен *Bac.anthraxis* в больших количествах.

Через 17 и 25 дней после отмены антибиотиков выжившие животные были убиты. В пробах из легких обнаружен возбудитель в высокой концентрации: в 95% случаев у свинок после применения ципрофлоксина и у 77% после применения доксициклина. Таким образом, применение данных антибиотиков не приводило к элиминации возбудителя из респираторного тракта. Протективные антитела у этих животных не обнаружены.

B. Sumerkan et al. (1996) изучали антимикробную чувствительность *Bac. anthracis* против макролидов (Табл. 29). Были подвергнуты изучению 34 изолята, выделенные в 1983-1994 гг. Препараты: азитромицин, клоритромицин, эритромицин, рокситромицин – показали хорошую активность против всех штаммов возбудителя антракса и, по мнению авторов, могут рассматриваться как альтернативные препараты при лечении кожных поражений при антраксе.

Таблица 29.

Активность антибиотиков против
Bac. anthracis in vitro
(по B. Sumerkan et al., 1996)

Антибиотики	Минимальная ингибирующая концентрация (мг/мл)		
	интервал	50%	90%
Азитромицин	0,5 – 4	1	4
Клоритромицин	0,03 – 0,25	0,06	0,12
Эритромицин	0,25 – 1	0,5	1
Рокситромицин	0,06 – 0,25	0,25	0,25

N. Lightfool, R. Scott, P. Turnbull (1990) изучили антимикробную чувствительность 70 изолятов *Bac. anthracis* к 9 препаратам. Два штамма оказались резистентными к пенициллину и продуцировали β-лактамазу, 69 штаммов были резистентны к цефуроксиму и два штамма показали промежуточную резистентность к стрептомицину. Все 70 штаммов были чувствительны к гентамицину, эритромицину, хлорамфениколу и тетрациклину. Новый хиноловый антимикробный агент – ципрофлоксацин показал очень хорошую активность.

Более подробно описано лечение сибирской язвы у людей. Следует отметить, что оно не всегда было эффективным. Так, P. Bhat, N. Mohan (1989) сообщают из Южной Индии, что все три пациента, у которых установлен антракс в форме первичного менингита, кишечной и кожной формах с септициемией, несмотря на лечение внутривенными инъекциями антибиотиков и стероидов, умерли через 12-14 часов.

M. Doganay (1989) в Турции лечил больных антраксом людей пенициллином, пенициллином+стрептомицином, эритромицином. Специфическую сыворотку не использовали.

Этот же автор (1996) приводит данные о заболеваемости и лечении больных антраксом людей (Табл. 30). Из 113 случаев в 107 была кожная форма антракса и в 6 – поражения горла. 15 больных подвергнуты обследованию и лечению (Табл. 31).

Таблица 30.
Распределение поражений у 113 пациентов,
больных антраксом

Локализация	Случаи	Количество умерших
Кожный, в т.ч.	107	-
-руки (кисти) и пальцы	79	-
-запястье и руки (от кисти до плеча)	10	-
-веки и лицо	11	-
-шея	2	-
-ступни и ноги (от бедра до ступни)	5	-
миндалины	5	3
язык	1	-

Таблица 31.
Анализ 15 случаев антракса человека

Число пациентов	15
Женщины/мужчины	6/9
Источник возбудителя инфекции и факторы передачи	
Убой и снятие кожи (шкур) КРС	8
Убой и снятие кожи (шкур) овец	3
Разделка «подозрительного» мяса	3
Не известен	1
Инкубационный период (интервал, дни)	2 - 13
Локализация поражений	
Кисти и пальцы	10
Запястье и руки (от кисти до плеча)	3
Веки	2
Единичное поражение	11
Два и более поражений	4
Обнаружение бактерий в поражениях	10/15*
Выделение культур	5/15*
Антибиотикотерапия: Пенициллин	11
Эритромицин	2
Не получали терапию	2**

Примечания: * - 10 пациентов получили антибиотики до взятия проб;

** - эти 2 пациента уже прошли курс лечения, до поступления в клинику оно было завершено.

169
По данным А.
которых антракс
отмечают, что ра
лений, хотя язва
О результатах
сообщают такж
Р. Turnbull (198
ной формой - 60
шечной - 2 (0,3
альные проявл
Эпидемия антра
опе.
М. Lalitha, V
та у людей и оди
ционный абсцес
лечению этих не

Суммарные

Возраст/пол, род занятий	Кли
55/ж, домохозяйка	Отек конеч сторон локал лихор Прод дня. инфе Конт

Все случаи м
внутривенно, 2 м
течение 14 суток
езно больны, леч
млн ЕД ежеднев
тяжесть заболев
тяжелым, пеници
но, дважды в де
10-14 суток. Все
лечению, в то в
нингоэнцефалит
блюдали в течен
Характерный пр
мозга.

По данным A. Pugh, I. Dabies (1989), в Зимбабве лечили людей, у которых антракс проявлялся в виде кожных поражений. Авторы отмечают, что раннее лечение эффективно и снижает число осложнений, хотя язвы при этом всегда долго заживают.

О результатах лечения больных антраксом людей в Зимбабве сообщают также W. Kobuch, T. Dasis, K. Fleisher, M. Jsaacson P. Turnbull (1989). Всего пациентов было 621, в т.ч. больных кожной формой – 607 (97,8%), орально-ротоглоточной – 10 (1,6%), кишечной – 2 (0,3%) и у 2 (0,3%) имели место вторичные менингеальные проявления болезни. 7 из 621 пациента погибли (1,1%) Эпидемия антракса последовала сразу за эпизоотией в том же регионе.

M. Lalitha, V. Anandi et al. (1989) описывают 3 случая менингита у людей и один уникальный случай, представленный как «инфекционный абсцесс». Приводятся данные по клинической картине и лечению этих необычных форм антракса у людей (Табл. 32, 33).

Таблица 32.

Суммарные данные о пациентах со злокачественным отеком

Возраст/пол, род занятий	Клинические данные	Лабораторные данные		Исход
		экссудат	кровь	
55/ж, домохозяйка	Отек правой верхней конечности и правой стороны шеи и груди с локальной болью, лихорадка, диспноэ. Продолжение болезни 22 дня. Источник возбудителя инфекции? Контаминированная почва?	Мазок. Много грамположительных бацилл. Культура большой рост Bac. anthracis	Лейкоциты 14300/мл. Мазок. Бацилл не обнаружено. Культура роста нет	Пациентка выздоровела

Все случаи менингита лечили большими дозами пенициллина внутривенно, 2 млн ЕД каждые 2 часа (12 до 24 млн ЕД в день) в течение 14 суток. Пациентов с кожной формой, которые были серьезно больны, лечили введением пенициллина внутривенно по 12-24 млн ЕД ежедневно, разделенных на 6 доз. Спустя 5-7 дней, когда тяжесть заболевания уменьшалась и проявление становилось менее тяжелым, пенициллин применяли в дозе 800000 ЕД внутримышечно, дважды в день. Общая продолжительность лечения составляла 10-14 суток. Все пациенты с кожной формой антракса поддавались лечению, в то время как из пациентов с клинической картиной менингоэнцефалита выжили только двое. Большинство смертей наблюдали в течение 24 часов после поступления больных в клинику. Характерный признак при летальных исходах – интенсивный отек мозга.

Таблица 33.
Суммарные данные о пациентах с менингитом

Возраст/пол, род занятий	Клинические данные	Лабораторные данные		Исход
		Спинномозговая жидкость	Кровь	
65/м, фермер	Кашель, лихорадка, головная боль, головокружение, раздражительность и наконец шок. Продолжительность болезни – 3 дня. Первичный очаг не известен	Мутная и геморрагичная. Мазок: много грамположительных бацилл. Культура: Bac. anthracis	Лейкоциты 23000/мл. Мазок: мало грамположительных бацилл. Культура: Bac. anthracis	Пациент умер
40/м, фермер	Лихорадка, рвота, беспокойство, конвульсии и потеря сознания. Продолжительность болезни – 1 день. Первичный очаг неизвестен.	Мутная и геморрагичная. Мазок: много грамположительных бацилл. Культура: Bac. anthracis	Лейкоциты 22000/мл Мазок: мало грамположительных бацилл. Культура: Bac. anthracis	Пациент умер
25/м, фермер	Головная боль, лихорадка, рвота, дезориентация и конвульсии. Продолжительность болезни – 1,5 дня. Первичный очаг неизвестен.	Мутная и геморрагичная. Мазок: много грамположительных бацилл. Культура: Bac. anthracis	Лейкоциты 11500/мл Мазок: нет бацилл. Культура: нет роста	Пациент умер

Есть сообщение из Индонезии (S. Hardjoutomo, 1996) о применении антибиотиков. Автор считает, что раннее применение пенициллина при лечении больных животных в полевых условиях обеспечивало успех.

A. Friedlander (1998) описывает три известные клинические формы антракса у людей: кожная, составляющая более 95% случаев; орально-желудочная и ингаляционная. Он считает, что пенициллин в комплексе с поддерживающей терапией остается основным средством лечения, хотя *in vitro* возбудитель болезни чувствителен ко многим антибиотикам.

М.М. Зубаиров, О.Н. Чупахин, В.А. Гаврилов и др. (1998) разработали новый препарат Абактан для профилактики и лечения инфекционных болезней животных бактериальной (в т.ч. сибирской язвы) и вирусной природы, который включает пефлоксацин и мидаптан в соотношении 1:1. Пефлоксацин мезилат обладает высокой антибактериальной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий.

Антибактериальное действие Абактана, а также пефлоксацина и мидаптана изучали на жидких и твердых питательных средах с возбудителем сибирской язвы в споровой и вегетативной формах согласно Методическим указаниям по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных (1972). В ходе эксперимента определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) и минималь-

ную бактерицидную концентрацию (МБК), которую выражали в мкг/мл. В таблице 34 представлены результаты сравнительного изучения антибактериального действия Абактана, пефлоксацина и мидантана.

Таблица 34.
Антибактериальная активность химиопрепаратов

Химиопрепараты	Критерии оценки	Возбудитель сибирской язвы	
		вегетативная форма	споровая форма
Абактан	МИК (мкг/мл)	20,0	60,0
	МБК (мкг/мл)	40,0	100,0
Пефлоксацин	МИК (мкг/мл)	10,0	30,0
	МБК (мкг/мл)	20,0	50,0
Мидантан	МИК (мкг/мл)	0	0
	МБК (мкг/мл)	0	0

Из данных таблицы 34 видно, что Абактан, как и пефлоксацин, проявляет выраженное ингибирующее и бактерицидное действие в отношении возбудителя сибирской язвы. Более высокие, в два раза, значения МИК и МБК у Абактана объясняются весовым соотношением (1:1) мидантана и пефлоксацина в составе препарата. Мидантан антибактериального действия не проявил.

Испытания лечебно-профилактического действия препарата Абактан, пефлоксацина и мидантана при сибирской язве проводили на беспородных белых мышах массой тела 18-20 г в количестве 100 единиц. Мышей разделили на 10 групп по 10 единиц в каждой: 9 групп опытных и 1 – контрольная. Каждую группу содержали изолированно в индивидуальных клетках в условиях вивария. Мышей заражали подкожно сибиреязвенным штаммом «М-71» в дозе $2 \cdot 10^6$ спор в объеме 0,5 мл. Препараты вводили мышам подкожно в дозе 10^{-20} мг/кг массы тела один раз в сутки в течение 5 дней: 1, 4 и 7 группам – одновременно с заражением; 2, 5, 8 – через 1 сутки после заражения, 3, 6 и 9 группам – через 2 суток после заражения. 10 группа препаратов не получала, вводили физраствор – контроль. По всем группам проводили учет заболеваемости мышей, тяжесть проявления болезни и процент гибели. После гибели контрольной за опытными группами вели наблюдение в течение 5 дней. При проведении опыта учитывали следующие показатели: выживаемость, тяжесть проявления болезни и сроки гибели мышей. Результаты

исследования лечебно-профилактического действия препарата при сибирской язве представлены в таблице 35.

Таблица 35.
Лечебно-профилактическая
эффективность химиопрепаратов

Группы Животных	Препараты	Доза препарата (мг/кг)	Начало введения препарата после заражения	Количество мышей в группе	Заболело/пало	Выживаемость (%)
1	Абактан	20,0	с первого дня	10	0/0	100
2	Абактан	20,0	со второго дня	10	0/0	100
3	Абактан	20,0	с третьего дня	10	1/1	90
4	Мидантан	10,0	с первого дня	10	10/10	0
5	Мидантан	10,0	со второго дня	10	10/10	0
6	Мидантан	10,0	с третьего дня	10	10/10	0
7	Пефлоксацин	10,0	с первого дня	10	0/0	100
8	Пефлоксацин	10,0	со второго дня	10	0/0	100
9	Пефлоксацин	10,0	с третьего дня	10	1/1	90
10	Контроль	-	-	10	9/9	10

Из данных таблицы 35 видно, что Абактан и пефлоксацин обладают выраженным профилактическим и лечебным действием при сибирской язве в дозах соответственно 20,0 и 10,0 мг/кг массы тела при подкожном способе введения, защищая 90-100% белых мышей при 90-процентной гибели в контрольной группе. В лечебных дозах Абактан не обладает тератогенным и иммунодепрессивным действием, не влияет на воспроизводительную функцию животных.

7. ВОПРОСЫ ИММУНОЛОГИИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА), НОВЫЕ СРЕДСТВА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

Механизмы и факторы иммунитета довольно многообразны. Их разделяют на неспецифические и специфические. Большинство факторов иммунитета неспецифические, т.е. одинаково эффективные в отношении любого патогенного микроба. К неспецифическим факторам относятся: защитные свойства кожи и слизистых оболочек; фагоцитоз и барьерные функции лимфоидной системы; воспаление; С-реактивный белок; интерферон и др. Эффективность неспецифических факторов в отношении возбудителя сибирской язвы довольно подробно описана в книге Н.Г.Ипатенко, В.А.Гаврилова и др. «Сибирская язва» (1996).

После выздоровления от сибирской язвы у животных возникает стойкий и длительный иммунитет. Специфическую защиту организма от генетически чужеродных веществ осуществляет иммунная система. Механизмы специфической невосприимчивости организма к сибирской язве сложны и представлены комплексом факторов тканевой и гуморальной защиты. В настоящее время выявлено, что иммунитет вырабатывается в ответ на воздействие сибиреязвенного токсина, в состав которого входят протективный (иммуногенный), отечный и летальный факторы (И.А.Бакулов и др., 1996).

Иммунитет развивается двумя фазами – индуктивной и продуктивной. Наиболее подробно механизм возникновения иммунитета изучен при введении вакцин. Механизм формирования невосприимчивости под воздействием противосибиреязвенных вакцин понимают как процесс создания антитоксического иммунитета. Из места введения вакцины сибиреязвенный протективный антиген, вырабатываемый вакцинными штаммами бацилл, поступает в организм животного и вызывает раздражение лимфоидных и ретикулярных элементов лимфатических узлов и селезенки. В иммунологическую реакцию активно включаются и легкие. В организме происходит глубокая иммунная перестройка.

Для выявления в лимфоидных органах морских свинок клеток, синтезирующих специфические антитела к протективному антигену и соматическому полисахариду вакцинного штамма СТИ, введенного подкожно, использован непрямой метод флуоресцирующих антител Кунса. Содержание антигена определяли в мазках отпечатках методом люминесцирующих антител. Через 3 суток после вак-

цинации в месте введения препарата, а также в регионарных и контррегионарных лимфатических узлах обнаружено большое количество светящихся палочек и цепочек микробов. Наряду с ярко светящимися микробами выявлены вне клеток и в моноцитах светло-зеленые кокковидные и пылевидные формы антигена. В цитоплазме отдельных нейтрофилов и моноцитов имелись скопления антигена в виде светящихся гранул. В отдаленных (бронхиальный и предлопаточный) лимфатических узлах и в селезенке наибольшее количество антигена обнаружено на 7 и 15 сутки. На 30 сутки количество антигенсодержащих клеток во всех лимфоидных органах резко сократилось. Антиген в органах содержался в течение первых 7 суток в межклеточном пространстве, в цитоплазме нейтрофилов и моноцитов, на иммуноглобулиновых рецепторах лимфоцитов, а на 15-30 сутки — в основном в цитоплазме клеток (Н.Г.Ипатенко, В.А.Гаврилов, 1991).

При изучении содержания антител через 3 суток после вакцинации выявлены отдельные клетки, светящиеся желтовато-зеленым светом. Люминесцировали по 3 клетки в 50 полях зрения. В числе антителсодержащих клеток обнаруживали гемоцитобласты, юные и зрелые плазматические клетки, а также лимфоциты. Преобладали гемоцитобласты и юные плазматические клетки. На 7 сутки после иммунизации в регионарных лимфатических узлах насчитывали 48 люминесцирующих клеток в 50 полях зрения, в контррегионарных — 30, в отдаленных лимфатических узлах — 7-10, в селезенке — 10 клеток. На 15 сутки число светящихся клеток в лимфатических узлах уменьшилось: в регионарном до 32, в контррегионарном до 20, но увеличилось в отдаленном бронхиальном лимфатическом узле до 20, предлопаточном до 20, в селезенке до 24. Среди клеток, содержащих антитела к протективному антигену, регистрировали лимфоциты и зрелые плазматические клетки. Через 30 суток в лимфатических узлах, регионарных месту введения вакцины, насчитывалось 9 светящихся клеток, контррегионарных — 15, в отдаленных — 10-12, в селезенке — 18 клеток. В этот период животные были устойчивы к заражению значительными дозами сибиреязвенной культуры. В тканях лимфатических узлов (регионарных и отдаленных) и в селезенке выявлено много клеток, синтезирующих специфические антитела к протективному антигену; они располагались группами и образовывали клеточный клон, были также единичные светящиеся гемоцитобласты, юные плазматические клетки и лимфоциты. Имелись клетки, содержащие антитела к соматическому полисахариду бацилл сибирской язвы.

175
В опы
протектив
ческому п
были ед
антиген
тических
В.А.Гавр

При п
оресценц
в сыворот
протектив
оценки и
крупного
реязвенн

S.Nag

ских сви
трольного
ких сви

спор. Ко
антител о

тел отраж
повышало

ставляли
погибали

Для с
телю сиб

работки
цузский у

капсульн
его культу

две степе
России п

кий. Эти
ных от си

ки: их ну
ные поств

ли, так ка
точной ви

безопасны
В 1937
агаре в ат

В опытный период число клеток, синтезирующих антитела к протективному антигену, было значительно больше, чем к соматическому полисахариду. Последние обладали меньшим свечением и были единичными. Следовательно, сибиреязвенный протективный антиген обуславливает более интенсивную пролиферацию плазматических клеток, чем соматический полисахарид (Н.Г.Ипатенко, В.А.Гаврилов, 1990).

При помощи РСК, РДП, РНГА и непрямого метода иммунофлуоресценции Кунса можно обнаружить антипротективные антитела в сыворотках крови животных, вакцинированных сибиреязвенным протективным антигеном и живыми споровыми вакцинами. Для оценки иммунитета у привитых против сибирской язвы лошадей, крупного и мелкого рогатого скота может быть использован сибиреязвенный аллерген (см. раздел «Диагностика»).

S.Hardjoutomo, M.Wadikarta (1996) изучена корреляция на морских свинках между титрами Ig антител и уровнем защиты от контрольного заражения вирулентным штаммом *Bac.anthraxis*. Морских свинок вакцинировали в дозе 0,1 мл $1,0 \times 10^7$ /мл суспензией спор. Контрольное заражение проводили через 3 недели. Титры антител определяли методом ELISA. Установлено, что титры антител отражали степень защиты. Увеличение титров от 100 до 200 ед повышало этот показатель. Морские свинки, у которых титры составляли 200 ед, выживали в 100% случаев, при 100 ед все животные погибали после контрольного заражения.

Для создания активного искусственного иммунитета к возбудителю сибирской язвы используют вакцины. Основоположником разработки живой сибиреязвенной вакцины является великий французский ученый Л.Пастер, который еще в 1881 году аттенуировал капсульный вирулентный штамм *Bac.anthraxis* путем выращивания его культур при повышенной температуре ($42,5 - 43^\circ\text{C}$) и получил две степени понижения вирулентности культуры. Через два года в России подобную вакцину двух вариантов получил Л.С.Ценковский. Эти вакцины успешно применялись для предохранения животных от сибирской язвы, однако они имели существенные недостатки: их нужно было вводить двукратно, иногда они вызывали сильные поствакцинальные осложнения у животных, вплоть до их гибели, так как микробы, из которых готовили вакцины, обладали остаточной вирулентностью. Это послужило поводом к поиску более безопасных вакцин.

В 1937 году Sterne получил на 50-процентном сывороточном агаре в атмосфере CO_2 (65%) бескапсульный иммуногенный вари-

ант 34 F₂, который был предложен для изготовления антракс-вакцины. Эту вакцину применяют с профилактической целью во многих странах мира.

В 1940 году Н.Н.Гипсбург, используя свернувшуюся нормальную лошадиную сыворотку, получил из вирулентного штамма «Красная Нива» бескапсульный безвредный и иммуногенный мутант СТИ-1. Его использовали для изготовления вакцины, которую стали широко применять в СССР с 1942 года.

В 1946-1949 гг. С.Г.Колесов из вирулентного штамма «Шуя-2» получил слабовирулентный вариант «Шуя-15». Затем С.Г.Колесов и Ю.Ф.Борисович изготовили из этого штамма вакцину ГНКИ, но она не нашла широкого применения в стране.

Важнейшее звено в системе противосибиреязвенных мероприятий – вакцинация сельскохозяйственных животных. Специфическая профилактика сибирской язвы животных в нашей стране в течение 45 лет осуществлялась с применением вакцины СТИ. Это позволило значительно снизить количество вспышек болезни и в целом обеспечить достаточно устойчивое эпизоотическое благополучие хозяйств во многих регионах страны по сибирской язве. Однако в начале 80-х годов было отмечено, что этот препарат в определенной мере утратил свои полезные свойства – иммунитет возникал не у всех привитых животных, длительность и напряженность его значительно снизились, штамм утратил однородность. Попытка спасти положение рекомендацией о двукратном введении вакцины СТИ не имела успеха, т.к. это увеличивало расход вакцины и осложняло проведение массовых прививок.

Возникла необходимость создания новой, более эффективной вакцины против сибирской язвы. Такая вакцина была создана И.А.Бакуловым, В.А.Гавриловым и В.В.Селиверстовым (1983 - 1986) на основе ослабленного штамма № 55.

Сибиреязвенный штамм № 55 обладает высокой иммуногенностью, слабой вирулентностью и реактогенностью, образует у привитых животных более продолжительный иммунитет, чем вакцина из штамма СТИ. Кроме того, он не обладает реверсильностью при прямых пассажах на чувствительных животных и перемежающихся пассажах на животных и питательных средах. Максимальный срок персистенции культуры возбудителя сибирской язвы из штамма № 55 в организме лабораторных и сельскохозяйственных животных при введении в дозе 10^6 - 10^{10} спор, в зависимости от вида, не превышает 14 дней.

177
В 1984 году
ны комиссия
из штамма № 55
вакциной СТИ,
жили контролем
ных для данных
ний, связанных
Через 6 и 12
специальном ви
реязвенных шта
сибирской язвы
зах, соответству
10³ спор, для шт
Из представл
раженные культ
зации вакциной
привитых вакци
одна пала.

Иммуноге

Группа	Вакцина
Первая	Из штамма № 55
Вторая	СТИ-1
Третья	Контроль (непривитые)

Заражение ва
зало, что напряж
вакциной из шта
отмечено также,
после заражения
ма тяжело перебо
состояние было
лась в предел

В 1984 году в хозяйствах Владимирской области были проведены комиссионные испытания препарата. В первой группе вакциной из штамма № 55 иммунизировали 980 овец, во второй – 450 овец вакциной СТИ, в третьей – 100 невакцинированных животных служили контролем. После прививок животных содержали в естественных для данных хозяйств условиях. Поствакцинальных осложнений, связанных с остаточной вирулентностью штамма, не отмечали.

Через 6 и 12 месяцев по 20 овец из каждой группы размещали в специальном виварии и заражали культурами вирулентных сибиреязвенных штаммов Ч-7 и № 76. Споровые культуры возбудителя сибирской язвы вводили овцам внутрикожно в оттитрованных дозах, соответствующих 10 ЛД_{50} . Для штамма Ч-7 это составляло $15 \cdot 10^3$ спор, для штамма № 76 – 10^6 спор.

Из представленных данных (Табл. 36) видно, что все овцы, зараженные культурами Ч-7 и № 76, через 6 месяцев после иммунизации вакциной из штамма № 55 выжили, тогда как в группе овец, привитых вакциной СТИ, после введения культуры штамма № 76 одна пала.

Таблица 36.

Иммуногенность вакцин из штамма № 55 и СТИ-1 у овец

Группа	Вакцина	Штамм для заражения	Через 6 месяцев		Через 12 месяцев	
			заражено, голов	выжило, голов	заражено, голов	выжило, голов
Первая	Из штамма	№ 76	10	10	10	10
	№ 55	Ч-7	10	10	10	9
Вторая	СТИ-1	№ 76	10	9	10	8
		Ч-7	10	10	10	9
Третья	Контроль (непривитые)	№ 76	10	0	10	0
		Ч-7	10	4	10	0

Заражение вакцинированных животных через 12 месяцев показало, что напряженным иммунитетом обладали 95% овец, привитых вакциной из штамма № 55, и 85%, привитых вакциной СТИ. Было отмечено также, что животные, иммунизированные вакциной СТИ, после заражения культурами вирулентного сибиреязвенного штамма тяжело переболевали, а у привитых вакциной из штамма № 55 состояние было удовлетворительным и температура тела оставалась в пределах физиологической нормы.

Комиссионно установили сроки наступления иммунитета у овец, привитых противосибиреязвенными вакцинами из штамма № 55 и СТИ. Для этого через 7 и 14 дней, 6 и 12 месяцев после вакцинации проводили контрольное заражение животных культурой штамма № 76 в дозе 10^6 спор. Результаты испытаний показали, что вакцина против сибирской язвы из штамма № 55 создает у животных более напряженный и продолжительный иммунитет, чем вакцина СТИ. Результаты комиссионной апробации напряженности иммунитета у овец после применения вакцины из штамма № 55 дали основание для широких производственных испытаний.

Длительность иммунитета в эксперименте изучали у сельскохозяйственных животных различных видов. Установлено, что длительность иммунитета у овец — не менее 1,5 года, у крупного рогатого скота — 1,5 года и у свиней — 1 год (срок наблюдения) (В.А.Гаврилов, Н.Г.Ипатенко, 1991).

Изучение сроков хранения вакцины показало, что она хранится в течение двух лет без потери своих основных свойств.

Делались попытки получить сибиреязвенные вакцины из убитых бацилл, но они не вызывали образования в организме животного стойкого и длительного иммунитета. Известно, что для формирования иммунитета необходимо наличие протективного антигена, который выделяют бациллы. Неудачи с убитыми вакцинами, видимо, следует объяснять недостаточным накоплением протективного антигена в таких вакцинах. Другое дело, когда используют живые вакцины. При введении их в организм бескапсульные бациллы распространяются по нему и некоторое время живут и размножаются.

Установлено, что введенные под кожу споры вакцины быстро прорастают. Через 3 часа бациллы обнаруживали в регионарных, а позже и в отдаленных лимфатических узлах, селезенке, печени и других органах, где они продолжали размножаться (В.А.Гаврилов, 1989).

Находящиеся в организме животного сибиреязвенные бескапсульные бациллы постоянно образуют протективный антиген, который и обуславливает создание невосприимчивости организма к сибиреязвенной инфекции.

Многочисленными опытами по применению протективного антигена для вакцинации лабораторных животных (белых мышей, золотистых хомячков, морских свинок, кроликов и обезьян) доказана его высокая иммунизирующая активность. Уровень иммунитета в значительной степени зависел от активности антигена, дозы, числа инъекций и интервала между введениями препарата.

Для выделения, концентрации и очистки сибиреязвенного протективного антигена использовали различные химические и физические методы: диализ, адсорбцию, осаждение кислотами и спиртом, выаливание, лиофильное высушивание, гель-фильтрацию на сефадексах.

Установлено, что протективный антиген по своим свойствам как абациллярная вакцина для иммунизации против сибирской язвы сельскохозяйственных животных обладает теми же качествами, что и современные живые споровые вакцины, но при его введении создается менее продолжительный и менее напряженный иммунитет.

Как известно, для эффективной иммунизации против сибирской язвы требуется присутствие протективного антигена (РА) в вакцине, которая может быть или химической в комбинации РА с адьювантом, или живой вакциной, экспрессирующей РА. Для того, чтобы определить, какой домен РА имеет важное значение в индуцировании иммунитета, были изучены протеолитические фрагменты РА — P_{47} , P_{37} , P_{17} (S. Little, B. Ivins et al., 1996). Воздействие химотрипсином на РА приводило к выделению аминоконцевого фрагмента 37 килодальтон (P_{37}) и карбоксилконцевого фрагмента 47 килодальтон (P_{47}), в то время как, используя протеолиз с помощью трипсина и химотрипсина, из P_{47} получали фрагменты 20 кДа (P_{20}) и 17 кДа (P_{17}). Последние два были аминоконцевой и карбоксилконцевой соответственно. Все фрагменты РА были очищены хроматографическим способом и были использованы для иммунизации морских свинок в дозе 16 мг в 0,5 мл РА с адьювантом Риби. Контрольное заражение проводили спустя 6 недель в дозе 10000 спор (100 LD₅₀). Для оценки антител сыворотки крови получали за 3 дня до контрольного заражения, исследовали методом ELISA.

Однократное введение цельного РА обеспечивало защиту 75-81% животных, P_{37} — 56%, в то же время P_{47} и P_{17} не обеспечивали существенной защиты. Два последних фрагмента индуцировали также низкий уровень антител по сравнению с другими препаратами (Табл. 37).

Эти результаты показали, что одним из решающих эпитопов, вовлеченных в защиту против антракса, остается аминоконцевой фрагмент P_{37} . Отсутствие эффекта с P_{17} и P_{47} , возможно, связано с очисткой фрагментов.

Абациллярные вакцины лишены недостатков, свойственных инактивированным вакцинам, в состав которых входят антигенные структуры всей микробной клетки. Последние вызывают образование многих специфических иммуноглобулинов на эти антигены, что обус-

Таблица 37.

Защитный эффект у морских свинок, иммунизированных однократно различными препаратами протективного антигена

Антигены	Выжившие/погибшие животные	Процент защиты	Титр антител
РА	12/16	75	3198
РА (обработан мочевиной, контроль)	13/16	81	5040
P ₄₇	1/16	6	217
P ₃₇	9/16	56	1337
P ₁₇	0/14	0	153
NaCl 0,15M	0/8	0	96

ловливает нежелательную иммунологическую нагрузку. Протективный антиген данными свойствами не обладает. Он не вызывает осложнений, которые свойственны живым ослабленным вакцинам при их введении в организм животного и, следовательно, имеет большое преимущество перед бациллярными вакцинами. Определенный интерес представляет и изучение комбинированной иммунизации животных живой споровой вакциной и протективным антигеном.

Однако, несмотря на достоинства разработанных в разные годы антракс-вакцин, многие из них нуждаются в усовершенствовании и улучшении параметров, связанных с иммуногенностью, продукцией РА и реактогенностью. Поэтому во многих лабораториях мира проводятся работы по клонированию детерминант иммуногенности *Bac.anthraxis* в разных бактериальных системах, созданию поливалентных вакцин, а также штаммов-суперпродуцентов РА и штаммов с пониженной реактогенностью.

Одно из самых активно разрабатываемых направлений – конструирование ркомбинантных штаммов, продуцирующих повышенные уровни РА.

Достижения генной инженерии последнего десятилетия позволяют осуществить выработку протективного антигена *Bac.anthraxis* в родственных почвенных бактериях.

Первоначально в качестве системы для экспрессии РА была избрана кишечная палочка. Показано, что рекомбинантный протективный антиген, экспрессированный в *E.coli*, имел молекулярную массу 83 кДа и был идентичен протективному антигену, выделенному из *Bac.anthraxis* (P. Gupta et al., 1998).

М.Vodkin и S.Leppla (1983) в качестве реципиентного штамма также использовали *E.coli*, а в качестве векторной молекулы – плазм-

миду pBR 322, в
ды pX01 *Bac.anth*
регистрацию эн
мл белка РА. С
крайне нестабил
фрагментов избы
B.Ivins, S.We
сии РА *Bac.anth*
кодирующий про
на *Bac.anthraxis*
го вектора pUB1
и (РА 2 [pРА 10
культурах, чем
уровень был 41,
Bac.subtilis 1S53
продуцировал та
и затрудняющие
L.Baillie, P.M
му экспрессии, с
ме *Bac.subtilis*,
Ген, кодирующи
Bac.subtilis, деф
честве около 40
ранней логариф
иммунологическ
Bac.anthraxis, и
Отечественн
нировали детерм
и изучили его
Bac.anthraxis. По
ные фрагменты
сутствует 3'-кон
ют часть протек
и защитные сво
противосибирея
лучены на осн
вень экспрессии
под собственны
ленная техноло
ние продуценти
производства ге

миду pBR 322, в которую встраивались Bam HI-рестрикты плазмиды pX01 *Bac.anthraxis*. У двух клонов методом ELISA удалось зарегистрировать экспрессию встроенного гена с наработкой 5-10 нг/мл белка РА. Однако полученные ими гибридные плазмиды были крайне нестабильными, возможно, из-за клонирования больших фрагментов избыточной чужеродной ДНК.

B.Ivins, S.Welkos (1986) первыми сообщили о системе экспрессии РА *Bac.anthraxis* на основе *Bac.subtilis*. Они клонировали ген, кодирующий протективный антиген трехкомпонентного экзотоксина *Bac.anthraxis* в *Bac.subtilis* 1S53 при использовании плазмидного вектора pUB110. Было получено два клона РА (РА 1 [pРА 101]) и (РА 2 [pРА 102]), которые продуцировали больше РА в жидких культурах, чем штамм Стерна *Bac.anthraxis*, у которого наибольший уровень был 41,9 мг/л. Основные неудобства при использовании *Bac.subtilis* 1S53 (pРА 102) заключались в том, что этот организм продуцировал также протеолитические ферменты, разрушающие РА и затрудняющие последующую очистку (L.Baillie et al., 1994).

L.Baillie, P.Moore, R.Manchee (1996) усовершенствовали систему экспрессии, основанную на протеолитически дефицитном штамме *Bac.subtilis*, и смогли получать РА в необходимых количествах. Ген, кодирующий экспрессию РА, был вставлен в штамм WB600 *Bac.subtilis*, дефицитный по протеазе. Продукция РА была в количестве около 40 мг/л. Высокий уровень экспрессии наблюдали в ранней логарифмической фазе культуры. Рекомбинантный РА по иммунологическим характеристикам подобен РА, продуцированным *Bac.anthraxis*, и вызывал сильные иммунные реакции у кроликов.

Отечественные ученые В.М.Тедиков и А.П.Добрица (1993) клонировали детерминанту протективного антигена *Bac.anthraxis* СТИ и изучили его экспрессию в клетках *E.coli*, *Bac.subtilis* и *Bac.anthraxis*. Получили гибридные плазмиды, содержащие различные фрагменты этого гена. Плазмиды pРА2 и pРА3, в которых отсутствует 3'-концевой участок РА размером около 1 т.п.н., кодируют часть протективного антигена, сохранившую иммунологические и защитные свойства. Авторы установили, что генно-инженерные противосибиреязвенные вакцины в первую очередь могут быть получены на основе рекомбинантных штаммов *Bac.subtilis*. Уровень экспрессии РА в клетках этой бактерии достаточно высок даже под собственным промотором. *Bac.subtilis* не патогенна, и промышленная технология ее культивирования хорошо отработана. Создание продуцентов РА на основе *E.coli*, широко используемой для производства генно-инженерных продуктов, вероятно, малоперспек-

тивно в связи с ингибирующим действием синтеза РА на клетки кишечной палочки. Получение супернатанта РА на основе сибиреязвенной бациллы требует изменения механизмов регуляции его синтеза. По мнению авторов, более эффективными будут генно-инженерные подходы при инактивации детерминантов LF и EF в геноме *Bac.anthraxis* с целью получения более безопасных противосибиреязвенных вакцин.

Живая туляремиальная вакцина, основанная на штамме 15, — одна из немногих бактериальных вакцин, обеспечивающих пролонгированный иммунитет и минимальные побочные эффекты, что делает штамм 15 *F.tularensis* весьма привлекательным бактериальным вектором для переноса гетерологичных протективных антигенов в макроорганизм. Ранее V.Pavlov et al. клонировали РА ген на pFNL200 плазмидном векторе в *F.tularensis*. Молекулярный вес клонированного белка в сконструированном *F.tularensis* (штамм РА 10) был определен в 83 кДа (согласно иммуоблотингу с моноклональными антителами против РА). Эти данные соответствуют таковым, полученным для РА, продуцированного в *Bac.anthraxis*. Рекомбинантный штамм продуцировал РА в количестве около $10\text{--}20 \times 10^3$ молекул на одну клетку (ELISA). Однако этот белок не обнаруживали в культуральном бульоне. Иммунизация мышей этим рекомбинантным штаммом индуцировала синтез специфических антител против РА, титры антител в ELISA доходили до 1:1280. Установлена корреляция между титром антител и дозой микроорганизма (в пределах от 10^2 до 10^6 бактерий). Рекомбинантный *F.tularensis* штамм РА 10 персистировал в селезенке мышей, по крайней мере, 7 дней после иммунизации (V.Pavlov et al., 1998).

По предварительным данным, вакцинация лабораторных животных с помощью туляремиальной вакцины, содержащей раг ген *Bac.anthraxis*, может создавать у них защиту одновременно против сибирской язвы и туляремии. Таким образом, преимуществом этого направления является возможность создания поливалентных рекомбинантных вакцин против возбудителей особо опасных болезней.

Для повышения экспрессии протективного антигена сделаны попытки использовать в качестве системы экспрессии *Bac.brevis*, апатогенный микроорганизм с низким уровнем протеазной активности, секретирующий большое количество экстрацеллюлярных белков, который с успехом применяли для многих гетерологичных белков (R.Paul et al., 1998; Hee Bok Oh et al., 1998). В этой системе получили секрецию рекомбинантного РА в количестве 295 мг на литр, который вступал в реакции с анти-РА моноклональными ан-

183
тителами. Его та
сыворотках кро
В качестве ве
и различные шт
вателей как бе
оральном введ
лами кишечник
der Star et al.,
ровать мукоз
Ig A антитела
доставляются
тельно появля
щиты. Была п
J. Barnard и
тивность неско
морских свинок
сконструирован
нетоксигенны
личными реко
ного влияния
мид in vivo, вы
и др. Протекти
титрами антит
vitro.
Недостатко
ется их нестаб
прессии, основ
системе удало
(L. Baillie et al.
мидах — 40 мг
В США дл
онная вакцина
ный антиген
супернатанта
V770-NP1R, в
этой вакцины
летальный фа
ет ее эффект
этого препара
живали после
255 до 760 ЛД
течение 3-5

тителами. Его также успешно испытали для обнаружения антител в сыворотках крови пациентов, больных сибирской язвой.

В качестве вектора экспрессии PA *Bac.anthraxis* были испытаны и различные штаммы *Lactobacillus*, привлечение внимание исследователей как безопасная система, которую можно использовать при оральном введении, поскольку лактобациллы являются комменсалами кишечника и обладают существенной адъювантностью (H. Van der Stap et al., 1998). Кроме того, оральные вакцины могут стимулировать мукозальную иммунную систему, вырабатывающую местные Ig A антитела в дополнение к системным реакциям. Эти векторы доставляются на поверхность слизистых, т.е. сайты, где действительно появляется инфекция и где расположена первая линия защиты. Была получена экспрессия высокого уровня PA в *L.casei*.

J. Barnard и A. Friedlander (1998) изучили протективную эффективность нескольких живых рекомбинантных антракс вакцин для морских свинок, иммунизированных одной дозой. Эти вакцины были сконструированы посредством трансформации двух бескапсульных, нетоксигенных штаммов *Bac.anthraxis* ANR и Sterne с 4-мя различными рекомбинантными плазмидами. Не отмечено существенного влияния штамма на продукцию PA *in vitro*, стабильность плазмид *in vivo*, выживание вакцинного штамма в организме животного и др. Протективная эффективность этих штаммов коррелировала с титрами антител к PA *in vivo* и уровнем PA, продуцированного *in vitro*.

Недостатком векторных систем, основанных на плазмидах, является их нестабильность. Была изучена эффективность системы экспрессии, основанной на деривате фага Ф 105 *Bac.subtilis*. В этой системе удалось достигнуть экспрессии PA только на уровне 2 мг (L. Baillie et al., 1998) по сравнению с системой, основанной на плазмидах – 40 мг (L. Baillie et al., 1996).

В США для вакцинации против антракса предложена лицензионная вакцина, представляющая собой преимущественно протективный антиген в форме адсорбированного на гидроокисе алюминия супернатанта из культуры токсигенного бескапсульного штамма V770-NPIR, выращиваемого в ферментерах. В некоторых партиях этой вакцины могут присутствовать другие компоненты (отечный и летальный факторы, антигены клеточной поверхности), что повышает ее эффективность. В опытах показана высокая эффективность этого препарата. Иммунизированные животные (10 обезьян) выживали после контрольного заражения аэрозолем спор в дозе от 255 до 760 LD₅₀, в то время как 5 контрольных обезьян погибли в течение 3-5 дней после заражения (B. Ivins et al., 1996).

M.Pitt, B.Ivins et al. (1996) провели изучение эффективности лицензионной вакцины в сравнении с очищенным рекомбинантным РА (масса 83000), соединенным с гидроокисью алюминия. 10 обезьян иммунизировали вакциной, 10 – 50 мг РА с гидроокисью алюминия (0,725 мг чистого алюминия на дозу), 2-м контрольным обезьянам ввели гидроокись алюминия в фосфатно-буферном растворе. Препараты вводили внутримышечно в объеме 0,5 мл, ревакцинировали через 28 дней. Через 3 месяца после иммунизации всех животных контрольно заразили аэрозолем спор антракса летальной дозой ($899 LD_{50} \pm 62$). Контрольные обезьяны погибли с 3 по 7 дни. Все животные, иммунизированные лицензионной вакциной, выжили; в группе вакцинированных очищенным рекомбинантным РА погибла одна из 10 обезьян, у которой выявили бактеремию низкого уровня и геморрагический менингит. Таким образом, не обнаружено статистических различий в индуцировании иммунитета у обезьян, иммунизированных лицензионной вакциной и рекомбинантным протективным антигеном.

В опытах M.Pitt et al. (1998) использовали лицензионную адсорбированную вакцину и белых кроликов новозеландской породы. Животных иммунизировали внутримышечно двукратно (через одну неделю) различными дозами – одной человеческой дозой и в разведении ее стерильным солевым фосфатным буфером от 1:4 до 1:256. Спустя 10 недель после первого введения кроликов заразили летальной дозой спор штамма Ames. Кролики, иммунизированные неразведенной вакциной и в разведении вакцины 1:4, выживали, в то время как получившие более высокие разведения (1:16, 1:64, 1:256) погибали. Погибли все контрольные животные.

Выживание кроликов сравнивали с реакцией антител. Использовали статистические модели для определения значений пика антител с целью предсказания выживания кроликов. Установлено, что уровни Ig G антител и токсиннейтрализующих антител, присутствующих в сыворотках в пик антительных ответов, были существенны ($p < 0,001$) для прогноза выживания. Это показывает, что на основании гуморального иммунного ответа на вакцину можно прогнозировать на модели кроликов защиту от ингаляционного антракса у людей.

Однако лицензионная вакцина не лишена недостатков. Необходимо проводить многократные инъекции – 6 доз в течение 18 месяцев с последующей ежегодной ревакцинацией. Кроме того, вакцина высоко реактогенна, а концентрация в ней протективного антигена варьируется от серии к серии. Поэтому исследователи предприни-

185
мают попытки со-
вать быструю за-
Все эффектив-
молекулярной ма-
предложено неск-
тиго протекти-
Была сделана
имодействия ток-
изводства безопас-
Под воздействи-
фрагменты РА 37
тов в биологичес-
ванием мутантны-
мутированные в
сину, были резист-
тами и могли быть
двойной мутацией
токсичен и может
тив антракса.
Во Франции п-
токсиндефицитны-
токсигенного штам-
ных из штамма Сто-
нием RP9, продуци-
лентность. In vivo
лярные антигены п-
вал образование ан-
(Табл. 38).
Антительны-
антигены м-

РХО1- Мутанти-
РХО1- (RP4, RP8, RP-

мают попытки создания альтернативной вакцины, способной вызвать быструю защиту и наименьшие местные реакции.

Все эффективные вакцины основаны на присутствии протеина с молекулярной массой 83000. В качестве альтернативной вакцины предложено несколько высокоочищенных препаратов рекомбинантного протективного антигена с разной молекулярной массой.

Была сделана попытка изучения молекулярного механизма взаимодействия токсина и использования полученных данных для производства безопасной и экономичной вакцины (Y. Singh et al., 1996).

Под воздействием трипсина и химотрипсина были получены фрагменты РА 37, 47 и 63 кДа. Роль протеазочувствительных сайтов в биологической активности токсина была изучена с использованием мутантных РА протеинов. Установлено, что РА протеины, мутированные в сайтах чувствительности к трипсину и химотрипсину, были резистентны к воздействию протеолитическими ферментами и могли быть очищены до более гомогенной формы. Мутант с двойной мутацией был более стабилен в супернатантах культур, не токсичен и может быть использован в качестве РА в вакцинах против антракса.

Во Франции на мышинной модели была изучена вирулентность 6 токсиндефицитных рекомбинантных штаммов *Bac.anthraxis* и нетоксигенного штамма, освобожденного от плазмиды pX01, выделенных из штамма Стерна. Все штаммы были авирулентны за исключением RP9, продуцирующего токсин, который имел остаточную вирулентность. In vivo был изучен антительный ответ на экстрацеллюлярные антигены вегетативных бацилл. Только штамм pX01⁺ вызывал образование антител против этих антигенов (J.Sivard et al., 1996) (Табл. 38).

Таблица 38.

Антительный ответ на вегетативные экстрацеллюлярные антигены мышей, иммунизированных токсиндефицитными штаммами Bac.anthraxis

Мутантные штаммы	Титры антител (ELISA)
pX01 ⁻	50
pX01 ⁺ (RP4, RP8, RP9, RP10, RP31, RP42)	1600

Сделан вывод, что плазмида рХ01 необходима для развития спор *in vivo*. Возможно, она кодирует факторы, вовлеченные либо в прорастание и размножение спор, либо в резистентность защитных механизмов хозяина. Кроме того, штаммы рХ01⁺ персистировали дольше в месте инъекции, чем штамм рХ01⁻, лишенные плазмиды. Эти две характеристики были также существенны для силы живых вакцин. По мнению авторов, изученные 6 штаммов являются хорошими кандидатами в качестве вакцинных. Штамм Стерна и его дериваты продуцируют большое количество компонентов токсина *in vivo* и *in vitro*, что свидетельствует о регулировании экспрессии генов токсина на уровне транскрипции. Эти данные показывают, что *Bac.anthraxis* может быть потенциальным вектором экспрессии гетерологичных антигенов.

В Великобритании в 50-х годах разработана вакцина для медицинских целей. Протективные свойства изучены на вакцинированных макаках-резус после контрольного заражения аэрозолем спор штамма Vollum. В 90-е годы проведено изучение этих свойств вакцины на морских свинках, контрольно зараженных штаммами Ames, New Hampshire и Vollum. Установлено, что на выживание морских свинок влияли особенности штамма, используемого в аэрозоле, серия вакцины, уровень протективного антигена и адъюванта (M.Jones, R.Beedham, P.Turnbull et al., 1996).

Применяемая в Великобритании для человека адсорбированная антракс-вакцина состоит из адсорбированного на гидроокиси алюминия супернатанта, главным образом протективного антигена из культуры токсигенного бескапсульного штамма *Bac.anthraxis* V770-NP1-R, выращиваемой в ферментерах. Результаты экспериментов показали, что иммунизация этой вакциной вызывает защиту против контрольного заражения *Bac.anthraxis* штаммов Ames и Vollum IV, хотя он менее эффективен против Ames штамма у морских свинок по сравнению с кроликами и нечеловекообразными приматами. Другие опыты показали, что вакцинация вызывает меньшую защиту у морских свинок против отдельных штаммов *Bac.anthraxis*. В этой работе испытана эффективность вакцины у морских свинок после контрольного заражения (внутримышечно) вирулентными штаммами *Bac.anthraxis*, выделенными от различных хозяев в разных географических зонах. Было отобрано 34 штамма для изучения эффективности адсорбированной антракс-вакцины. Отмечено выживание среди вакцинированных групп животных от 6 до 100% (P.Fellows et al., 1998).

К. Fowler, В. McBride, Р. Turnbull, L. Baillie (1998) сравнивали протективную эффективность рекомбинантного РА, продуцированного в клетках *Bac. subtilis* (с адьювантом Рибидина или гидроокисью алюминия), с РА, полученным из вакцины, применяемой в Великобритании для человека, на иммунизированных морских свинках, после контрольного заражения аэрозолем спор штамма Ames *Bac. anthracis*. Рекомбинантный РА с адьювантом Рибидина, так же как и РА, продуцированный вакциной, защищал 100% животных, контрольно зараженных высокими дозами штамма Ames (остаточная доза в легких около 10^6 спор).

Этот препарат у морских свинок и мышей индуцировал более выраженный ответ Ig G2 по сравнению с другими вакцинами и не отличался по уровню Ig G1 ответа. Специфические сыворотки морских свинок вызывали пассивную защиту интактных морских свинок и мышей, что свидетельствует об их нейтрализующей активности.

Как известно, вакцинация – наиболее эффективная форма профилактики инфекционных болезней. Применение аттенуированной живой споровой вакцины у животных, такой как вакцина Стерна, значительно снизило инцидентность антракса у домашних животных. Что касается опасений относительно остаточной вирулентности, то живые споровые вакцины не используются в Великобритании и США. В Великобритании вакцина против антракса применяется с 1963 года, и с этого времени использовано более 50000 доз. Вакцина состоит из белкового преципитата, выделенного из супернатанта культур штамма Стерна. Мажорный иммуноген является нетоксичным протективным антигеном, связанным с другими компонентами токсина антракса. L. Baillie et al. (1998) предприняли попытку разработки моделей животных, которые обеспечат информацию по иммунологической защите, генерируемой вакциной у человека. Недавняя работа с морскими свинками показала важность нейтрализующих антител. В то время как изучение антракс-вакцин на животных может обеспечить получение полезной информации, они никогда не могут заменить изучение на человеке. Удивительно, что так мало известно относительно основ иммунологической защиты у людей, вакцинированных против ряда болезней. Авторами сделана попытка разобраться в основах иммунных реакций человека на используемую в Великобритании вакцину против антракса. Они сравнивали антительный ответ к РА у вакцинированных здоровых индивидуумов и у больных, инфицированных *Bac. anthracis* естественным путем. Обнаружили, что у тех и у других были сходные профили антител IgG изотипов в определенный период.

В России проведена сравнительная оценка иммунологических свойств сухих препаратов комбинированных и живых вакцин, изготовленных на основе штаммов СТИ-1 и 55/5 (Т. Anisimova et al., 1996). У морских свинок развивался высокий уровень иммунитета после инокуляции комбинированной вакцины в дозе 11×10^6 спор штамма 55/5 с $40 ID_{50}$ протективного антигена и в дозе 50×10^6 спор штамма СТИ-1 вместе с $40 ID_{50}$ протективного антигена. Эффективность комбинированной вакцины превышала таковую живой моновакцины из штамма СТИ-1 и 55/5. Ее параметры отвечали требованиям фармакопей. У овец, вакцинированных комбинированной вакциной, более высокий протективный эффект был отмечен на 10-й день после иммунизации. Соответственно у телят (возраст 3-6 месяцев), вакцинированных комбинированной вакциной, титр анти-тел был более чем в 2 раза выше по сравнению с вакцинированными споровой моновакциной.

М. Besnosov et al. (1996) предложили компонент для будущих химических вакцин. Авторы выделили из вегетативных клеток штамма СТИ-1 *Bac. anthracis* протеин с молекулярной массой 92 кДа. В комбинации с адьювантом Фрейнда этот белок вызывал образование протективных антител у экспериментальных животных, у которых наблюдали также увеличение фагоцитоза и формирование ГЗТ. У морских свинок после двух подкожных инъекций препарата развивался высокий уровень защиты к контрольному парентеральному заражению спорами *Bac. anthracis*.

До настоящего времени ни в России, ни за рубежом не была предложена единая вакцина для специфической профилактики сибирской язвы (антракса) людей и животных. Такая вакцина была разработана в НИИ микробиологии (г. Киров) Е. В. Пименовым, Ю. С. Жучихиным, Г. В. Комоско, В. В. Шведовым и др. (1998). Универсальная вакцина «УНИВАК» состоит из смеси жизнеспособных спор вакцинного штамма возбудителя сибирской язвы и очищенного концентрированного адсорбированного на геле гидроокиси алюминия протективного сибиреязвенного антигена. Вакцинацию проводят подкожно-шприцевым или подкожно-безыгольным способами. «УНИВАК» обеспечивает формирование напряженного иммунитета через 7 суток после первичного однократного применения; продолжительность иммунитета – не менее 1,5 лет. Срок годности вакцины – 3 года (срок наблюдения). Особенностью разработанного регламента производства вакцины является использование эффектов кислородного лимитирования и коррекции питательной среды с целью повышения урожая биомассы и устойчивости спор к воз-

действию внешних факторов на стадиях технологической обработки и выживаемости спор при хранении готового продукта. При использовании опытно-промышленных серий универсальной вакцины на лабораторных и сельскохозяйственных животных, а также после вакцинации людей осложнений не наблюдали; рекламаций на вакцину не было.

Известно, что постановка своевременного вакцинного производства на уровне, отвечающем международным требованиям, невозможна без внедрения в него комплексной системы управления качеством продукции. Одним из элементов этой системы контроля является разработка комплексных показателей, необходимых для оценки уровня качества продукции и выбора ее базового образца (отраслевого стандартного образца сравнения), т.е. реально достижимой совокупности значений показателей качества в соответствии с современными достижениями науки и производства. Исследования в этом направлении крайне важны в плане унификации и стандартизации выпускаемой продукции. Применительно к разработанной технологии изготовления вакцины «УНИВАК» и самого продукта авторами разработаны методические подходы по контролю за соблюдением регламента производства и основные показатели оценки вакцины. Изготовлен отраслевой стандарт вакцины, который является эталоном для выпуска продукции. Приведенные интегральные и единичные показатели оценки устойчивости эталонных культур и вакцин позволяют получить важную информацию о качестве препаратов в процессе их приготовления и, следовательно, прогнозировать потенциальную жизнеспособность спор при хранении.

В качестве еще одного направления совершенствования сибиреязвенных вакцин можно назвать повышение эффективности молекулярных сибиреязвенных вакцин методами адъювантной технологии и белковой инженерии. Как известно, конструирование вакцин, лишенных балластных веществ, и повышение их иммуногенности можно осуществить традиционными методами: укрупнением и полимеризацией молекул антигена, конъюгированием его с минеральными веществами или синтетическими полимерами, т.е. созданием адъювантных, сорбированных препаратов, которые иногда называют полусинтетическими вакцинами. Полусинтетическая вакцина состоит из специфического антигена в молекулярной форме, носителя (сорбент, синтетический полимер) и адъюванта (носитель выполняет в вакцине и роль адъюванта). Известно, что сорбирующие адъюванты (гидроокись алюминия и др.) повышают иммуногенность белковых антигенов в десятки и сотни раз.

По мнению некоторых исследователей (В.В.Кожухов и др., 1995, 1997), конструирование вакцин с использованием комбинации сухих компонентов (живые споры и сорбированный РА) обеспечивает значительное повышение иммунологической эффективности и сроков годности вакцинных препаратов против сибирской язвы.

В последние годы разработано несколько новых адъювантов для возможного использования у человека. Это монофосфориллипид А, треоил-мурамилпептид и несколько стабильных микрофлюидизированных масляных эмульсий, действующих в качестве антигенных носителей.

В. Ivins et al. (1995) при разработке антракс-вакцины, обладающей меньшей реактогенностью и большей иммуногенностью, предложили наиболее эффективную для этих целей комбинацию, состоящую из РА и одного из следующих носителей: монофосфориллипида А в эмульсии сквален-лецитин-твин-80 и сапонины QS-21.

В экспериментах на модели морской свинки вакцина в такой композиции оказалась более эффективной, чем лицензионные для человека английская и американская антракс-вакцины, содержащие в качестве адъюванта гидроокись алюминия. Полагают, что указанная комбинация обеспечивает развитие как гуморального, так и клеточноопосредованного иммунитета.

Существенный вклад в решение проблемы конструирования молекулярных и живых вакцин с повышенной иммуногенностью, вероятно, могут внести современные методы белковой инженерии.

Проводившиеся в 90-х годах исследования молекулярных механизмов действия антракс токсина и по выявлению функционально значимых доменов РА позволили выявить в его структуре сайты специфического протеолитического расщепления. По мнению некоторых исследователей, повышение устойчивости РА к протеазам методами белковой инженерии за счет делетирования или путем изменения сайтов специфического расщепления РА теоретически является перспективным направлением (S.Little, B.Ivins, P.Fellows, A.Friedlander, 1996).

К середине 90-х годов сформировалось принципиально новое направление – ДНК-вакцинация, послужившее основой для создания вакцин нового поколения. Применительно к антракс-вакцинам оно, вероятно, будет разрабатываться и найдет применение в обозримом будущем. Как известно, все до сих пор используемые способы вакцинации связаны с введением в организм антигенов, убитых или живых бактерий, очищенных белков и даже пептидов. Новое направление основано на явлении длительной транзигентной эксп-

рессии в цитоплазме эукариотических клеток человека и животных нуклеиновых кислот, не встраивающихся в геном, но поддерживающих синтез кодируемых ими белков в течение нескольких недель и месяцев (Н.Т.Васильев, Е.В.Пименов, В.В.Кожухов, Ю.И.Строчко, В.В.Зубов, 1999).

Установлена возможность длительной экспрессии кодируемого плазмидой репортерного гена под контролем промотора цитомегаловируса (J.Wolf et al., 1990). D.Tang et al. (1992) показали, что после ДНК-вакцинации у животных вырабатываются антитела.

Было также доказано, что нуклеиновые кислоты способны проникать в клетки мышечной ткани и длительное время сохраняться там, поддерживая синтез кодируемых ими белков на протяжении нескольких недель или месяцев. Необходимо только, чтобы экспрессируемый ген имел мощный эукариотический промотор и содержал последовательности, обеспечивающие трансляцию м-РНК (В.Г.Дебабов, 1997).

Специалисты единодушно предрекают геновакцинации блестящие перспективы. Имунные реакции у мышей на ДНК-вакцину, введенную внутримышечно, были идентичны таковым, развивающимся после традиционной иммунизации белком на гидроокиси алюминия (E.Williamson et al., 1998). Для формирования иммунитета достаточно одной внутримышечной или подкожной инъекции, причем эффективность последней выше (E.Roz et al., 1996). Характер этого иммунного ответа усилен по сравнению с таковым, получаемым с помощью белковых антигенов, так как формируется не только гуморальный, но и клеточный иммунитет (J.Ulmer et al., 1993).

В настоящее время получены данные о возможности применения ДНК-вакцинации и получении полноценного иммунного ответа не только на примере вирусов, но и бактериальных инфекций — сальмонеллеза, туберкулеза, коклюша (C.Macias et al., 1995; K.Nuygen et al., 1996; А.Б.Панферцев и др., 1996).

По мнению Н.Т.Васильева и др. (1999), ДНК-вакцинация может найти применение при создании сибиреязвенных вакцин нового поколения с повышенной иммунологической эффективностью, особенно для лиц, предрасположенных к аллергии.

Преимущества ДНК-вакцинации состоят в том, что отпадает необходимость манипулировать с патогенными вирусами и бактериями, проводить сложную и дорогостоящую очистку антигенов, получаемых методами генетической инженерии, и появляется возможность синтеза вакцин с помощью ПЦР.

Развитие геновакцинации в большинстве развитых стран идет быстрыми темпами. Некоторые ДНК-вакцины уже проходят клинические испытания (В.Г.Дебабов, 1997). С этим направлением связывают надежды на эффективную профилактику и лечение многих болезней.

Однако, по нашему мнению, несмотря на хорошие перспективы, практическая реализация этого подхода потребует длительного времени для проведения исследований по изучению безопасности вакцин нового поколения и снижения себестоимости их производства.

Одна из интересных глав в иммунологии – это **изучение ассоциированных вакцин** с целью иммунизации животных.

При конструировании ассоциированных вакцин необходимо уделять внимание правильному подбору соотношений компонентов с учетом их иммунологической активности. В результате многочисленных исследований установлено, что ассоциированную иммунизацию можно проводить при использовании различных типов антигенов: бактериального и вирусного происхождения, живых и инактивированных, анатоксинов.

Активность иммунитета при ассоциированной вакцинации зависит не только от соотношения применяемых доз каждого антигена, но и от иммунологической активности моноантигенов и состояния организма животного. Ряд ученых отметили, что реакция организма животных на введение ассоциированных препаратов мало чем отличалась от реакции на введение монопрепаратов.

Применяемые на практике моновакцины сами по себе надежны, но при одновременном возникновении двух или более инфекционных болезней в хозяйстве и населенном пункте их применение не всегда эффективно. При такой сложной эпизоотической ситуации лучше использовать ассоциированные препараты. Кроме того, ассоциированные вакцины целесообразно применять в стационарно неблагополучных пунктах по двум-трем инфекционным болезням (например, ассоциированная вакцина против сибирской язвы и эмкара). Помимо этого, применение ассоциированных вакцин имеет большое значение и с экономической стороны: уменьшение количества прививок, снижение затрат на проведение противоэпизоотических мероприятий, а также снижение стрессовой нагрузки на животных и др.

А.С.Собакин и И.А.Бакулов (1993) разработали ассоциированную вакцину против сибирской язвы и ящура типов А и О, используя вакцину против сибирской язвы из штамма 55-ВНИИВВиМ – живую споровую лиофилизированную и вакцину против ящура типов А и О из вируса, выращенного в культуре клеток ВНК-21.

При создании препаратов данного рода предварительно изучили теоретические аспекты: совместимость антигенов *in vitro* и *in vivo*, рассчитали дозу каждого антигена в прививном объеме. В ходе исследований установили ингибирующее действие диэтилэтиленимина (компонента противоящурной вакцины) на репродуктивные качества вегетативных сибиреязвенных клеток (негативное явление).

Для изучения иммуногенности вакцины две группы морских свинок иммунизировали двумя образцами ассоциированной вакцины против сибирской язвы и ящура подкожно в область белой линии живота в объеме 0,5 мл. Третью группу морских свинок использовали в качестве контроля. Напряженность иммунитета проверяли, заражая вакцинированных животных вирулентными штаммами: сибиреязвенный М-71 вводили подкожно в область белой линии живота в дозе 1,0 млн. спор, объем 0,5 мл; вирус ящура типов А и О — внутрикожно в плантарную поверхность одной из задних конечностей в дозе 10000 ЛД₅₀, объем 0,1 мл.

Иммунный ответ при сибирской язве оценивали с помощью кожно-аллергической пробы (КАП) и по титру противосибиреязвенных антител, определяемых в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). Наличие противоящурных антител определяли в реакции связывания комплемента (РСК) в соответствии с общепризнанными методиками.

Через 14 дней после вакцинации у морских свинок трех групп брали кровь для исследования в аллергической и серологических реакциях. Затем всех животных заражали возбудителями сибирской язвы и ящура.

Образцы ассоциированной вакцины создавали иммунитет у привитых животных против сибирской язвы и ящура (Табл. 39). В сыворотке крови морских свинок титр сибиреязвенных антител в РНГА в первой группе составил 1:80-1:160, во второй — 1:160-1:320; величина КАП — 10,5-12 и 11,5-14 мм соответственно. Контрольные животные не содержали сибиреязвенных антител, кожно-аллергическая проба у них была отрицательной. Все морские свинки, привитые первым и вторым образцами ассоциированной вакцины, выжили после заражения их сибиреязвенным капсульным штаммом М-71, а все контрольные пали. Иммунитет против сибирской язвы составил 100%, против ящура — 100% по типу А и 50% по типу О в первом случае и 100% по обоим типам во втором. Титр противоящурных антител в РСК у привитых животных был 1:16-1:32 в первой группе и 1:32-1:64 во второй. При заражении морских сви-

нок вирусом ящура установили, что все непривитые животные (контроль) заболели генерализованной формой ящура.

Ассоциированная вакцина (образец № 1) сохраняла свои свойства в течение 12 месяцев (срок наблюдения) после изготовления.

Оценка экспериментальных образцов ассоциированной вакцины против сибирской язвы и ящура показала, что свежеприготовленная вакцина (образец № 2) создавала напряженный 100-процентный иммунитет против сибирской язвы и ящура типов А-22 и О-194. При хранении ее до 12 месяцев иммунитет к сибиреязвенному штамму М-71 и вирусу ящура типа А-22 сохранялся, а к вирусу ящура типа О-194 – уменьшался на 50%, хотя в предварительных опытах наблюдали, что напряженный иммунитет сохранялся до 9 месяцев. Известно, что в процессе хранения ящурных вакцин часть иммунных 146S и 75S компонентов ящурных антигенов разрушается, что и произошло с вирусом типа О-194.

Таблица 39.

Оценка иммуногенности образцов ассоциированной вакцины против сибирской язвы и ящура

№ образца вакцины	Количество животных	Показатели иммуногенности					
		Сибирская язва			Ящур		
		РНГА	КАП	процент защиты	РСК	тип А процент защиты	тип О процент защиты
1	32	1:80- 1:160	Положительная	100	1:16- 1:32	100	50
2	32	1:160- 1:320	Положительная	100	1:32- 1:64	100	100
Контрольная группа	20	0	Отрицательная	0	0	0	0

Таким образом, ассоциированная вакцина против сибирской язвы и ящура создает напряженный иммунитет против обеих инфекций, но предпочтительнее использовать для иммунизации животных вакцину, изготовленную из свежеприготовленных серий монопрепаратов, обеспечивающих 100-процентную защиту против ящура и сибирской язвы.

Н.Г.Ипатенко, Л.В.Кириллов, Л.И.Сторожев, В.А.Гаврилов, И.А.Бакулов и др. (1999) разработали ассоциированную вакцину против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула, которую изготовили из спор вакцинного штамма 55 – возбудителя сибирской язвы и вакцинного штамма 2/14 – возбудителя эмкара. Эта вакцина была испытана на крупном рогатом скоте в возрасте 6 месяцев в условиях Петушинского района Владимирской области

Иммунизацию провели комиссионно в двух хозяйствах, неблагополучных по сибирской язве и эмкару. Всего было привито 311 голов. Препарат вводили подкожно в область средней трети шеи в дозе 2,0 мл. Одна доза вакцины содержала 20-25 млн спор штамма 55 и 8-10 млрд микробных клеток штамма 2/14. Иммунизированное ассоциированной вакциной поголовье крупного рогатого скота содержали на фермах в естественных условиях под наблюдением ветеринарных специалистов и членов комиссии. В течение 10 суток после прививки у животных не отмечали каких-либо поствакцинальных осложнений.

Через 7,5 месяца после вакцинации 5 привитых и 5 контрольных (интактных) животных заразили смесью вирулентных штаммов № 76 и Ч-7 возбудителя сибирской язвы. На 3-й день после заражения у контрольных животных отмечали клинические признаки, характерные для сибирской язвы, а на 5-й день они пали. У иммунизированных ассоциированной вакциной животных никаких отклонений от клинико-физиологического статуса в течение первых суток наблюдения после заражения не отмечали. Одновременно проверили иммуногенные свойства ассоциированной вакцины по отношению к эмфизематозному карбункулу. С этой целью заразили 3 иммунизированных и 3 контрольных животных сухой споровой тест-культурой Р 15 в смеси с 10-процентным раствором хлористого кальция в дозе 400 ЛД₅₀ для морской свинки. Все иммунизированные телята выжили, а контрольные погибли.

Таким образом, в результате испытания в производственных условиях ассоциированной вакцины против сибирской язвы и эмкара, изготовленной из штаммов 55 и 2/14, установили ее безвредность для крупного рогатого скота в использованных дозах и выраженную иммуногенность. В условиях эксперимента она предохраняла от заражения вирулентными культурами возбудителей сибирской язвы и эмкара 100% привитых животных через 7,5 месяца после однократной вакцинации (срок наблюдения). Необходимо отметить правильность подобранных антигенных соотношений, что является основой создания прочного иммунитета.

В отдельных регионах нашей страны, особенно в районах с отгонно-пастбищным содержанием животных, возникает необходимость одновременно вакцинировать овец против сибирской язвы и клостридиозов. В таких случаях целесообразно применять ассоциированную вакцину, которая позволяет за ограниченное время с экономией затрат труда и материальных средств иммунизировать животных против этих инфекций. Исходя из этого, К.Р. Ургуев, М.А. На-

жалов, И.А.Бакулов, Р.А.Нуратинов, В.А.Гаврилов (1999) разработали ассоциированную вакцину против сибирской язвы и клостридиозов овец, состоящую из вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ возбудителя сибирской язвы и анатоксинов, изготовленных из частично очищенных и концентрированных токсинов *Cl.perfringens* типов С и D.

Эффективность многокомпонентных вакцин определяется не только качеством антигенов, но и их количественным соотношением в составе препарата. Поэтому в процессе конструирования ассоциированной вакцины большое внимание было уделено подбору антигенов в оптимально эффективных дозах.

С целью изучения возможного взаимовлияния антигенов было изготовлено четыре варианта ассоциированной вакцины, различающихся количественным содержанием антигена сибирской язвы при неизменной дозе анатоксинов. В первом варианте в 1 см³ ассоциированного препарата содержалось 8 млн. жизнеспособных спор вакцинного штамма возбудителя сибирской язвы, во втором – 4 млн., в третьем – 2 млн., в четвертом – 1 млн.

Ассоциированной вакциной четырех вариантов, а также для контроля бивалентным анатоксином вакцинировали двукратно по 12 кроликов с интервалом 15 суток в дозе 0,5 см³. Для изучения напряженности иммунитета к сибирской язве вакцинировали по 3 морские свинки массой 350-500 г ассоциированной (4 варианта) и моновакциной в трех дозах. Для контроля через 20 суток после вакцинации морских свинок заразили 10-15 LD₅₀ стандартной культуры штамма 71/12 второй вакцины Ценковского.

Кроме того, изучали срок годности ассоциированной вакцины по отношению к сибирской язве в динамике в течение 15 месяцев. Определяли содержание жизнеспособных спор в препаратах, хранившихся в холодильнике (4-8°C) и в условиях комнатной температуры (18-22°C).

В результате многочисленных исследований установлено, что оптимальным является содержание в 1 см³ вакцины антигенов: вакцинного штамма возбудителя сибирской язвы в дозе 6-7 млн. микробных клеток, анатоксина *Cl.perfringens* типа С – 60-80 ЕС, типа D – 20-30 ЕС.

При исследовании иммунизирующих свойств 5 вариантов вакцины (4 опытных и 1 контрольной) против клостридиозов через 20 суток после повторной вакцинации в сыворотке крови кроликов всех групп обнаружили анитоксические антитела в титрах: по типу С – 0,46-0,52 АЕ, по типу D – 0,32-0,41 АЕ, и они существенно не

Вакцина
Ассоциированная, вариант 1
Ассоциированная, вариант 2
Ассоциированная, вариант 3
Ассоциированная, вариант 4
Моновакцина штамма 55
Контроль

Следовательно, тых животных д по активности п низирующая ак кой язвы наход щихся в привив а против клостр препарата. «Яв отрицательное щественное раз ны.

различались как между собой, так и с титрами антител кроликов, привитых бивалентным анатоксином.

При изучении напряженности иммунитета к сибирской язве установлено, что морские свинки, привитые как вариантами ассоциированной вакцины, так и моновакциной с содержанием в дозе 500 тыс. и более жизнеспособных спор, в 100% случаев оказались более устойчивы, чем невакцинированные (контроль) (Табл. 40).

Таблица 40.

Результат заражения морских свинок, привитых ассоциированной вакциной и монопрепаратом против сибирской язвы

Вакцина	Число спор в вакцине объемом 0,5 см ³	Пало	Выжило
Ассоциированная, вариант 1	4 млн.	0	3
	800 тыс.	0	3
	160 тыс.	2	1
Ассоциированная, вариант 2	2 млн.	0	3
	400 тыс.	1	2
	80 тыс.	3	0
Ассоциированная, вариант 3	1 млн.	0	3
	200 тыс.	1	2
	40 тыс.	3	0
Ассоциированная, вариант 4	500 тыс.	0	3
	100 тыс.	2	1
	20 тыс.	3	0
Моновакцина из штамма 55	1 млн.	0	3
	200 тыс.	1	2
	40 тыс.	3	0
Контроль	-	5	0

Следовательно, ассоциированная вакцина обеспечивает у привитых животных достаточно напряженный иммунитет, не уступающий по активности при вакцинации монопрепаратами. При этом иммунизирующая активность ассоциированной вакцины против сибирской язвы находится в прямой зависимости от количества содержащихся в прививочной дозе жизнеспособных спор вакцинного штамма, а против клостридиоза — от активности анатоксинов в единице объема препарата. «Явление иммунологической конкуренции» или другое отрицательное влияние одних антигенов на другие, несмотря на существенное различие их по соотношению компонентов, не выявлены.

В процессе хранения ассоциированной вакцины как в холодильнике, так и при комнатной температуре содержание жизнеспособных спор вакцинного штамма возбудителя сибирской язвы существенно не изменилось (Табл. 41).

Таблица 41.

Количество жизнеспособных спор вакцинного штамма возбудителя сибирской язвы в процессе хранения ассоциированной вакцины, млн/1 см

Условия хранения	Срок хранения, месяцы						
	3	6	8	9	10	11	15
В холодильнике	7,8	7,5	7,4	7,6	7,2	7,4	7,2
При комнатной температуре	7,8	7,4	6,8	7,5	7,3	7,0	6,8

Из таблицы видно, что в процессе хранения ассоциированной вакцины в течение 15 месяцев количество жизнеспособных спор снизилось незначительно и, следовательно, можно полагать, что иммунизирующие свойства препарата по отношению к сибирской язве существенно не изменились (следует иметь в виду, что варьирование количества микробных клеток менее чем на 25% считается вполне допустимым при определении методом посева десятичных разведений).

При определении срока годности ассоциированной вакцины по отношению к клостридиозам установлено, что наибольшие титры антитоксических антител *Cl. perfringens* типов С и D были у кроликов, привитых ассоциированной вакциной, хранившейся в течение года при температуре 4-8°C. Снижение активности ассоциированной вакцины, хранившейся в течение года при комнатной температуре, возможно, обусловлено разрушением части антигена при неблагоприятных температурных условиях.

Для изучения иммуногенной активности на овцах в производственных условиях была изготовлена ассоциированная вакцина, где в 1 см³ препарата содержалось: анатоксина *Cl. perfringens* типа С — 65 ЕС, типа D — 28 ЕС и 6 млн жизнеспособных спор вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ возбудителя сибирской язвы. В одном неблагополучном по сибирской язве и клостридиозам хозяйстве Республики Дагестан более 3000 овец, разделенных на 5 групп, вакцинировали ассоциированной вакциной однократно и двукратно в разных дозах (3 и 5 см³), а также моновалентной вакциной против сибирской язвы и бивалентным анатоксином. Вакцину вводили под-

кожно в область предплечья. Часть овец не вакцинировали, они служили контролем.

Длительность и напряженность иммунитета по отношению к клостридиозам в течение 9 месяцев контролировали на 12 животных из каждой группы, привитых ассоциированной вакциной и бивалентным анатоксином, по титру антитоксических антител с помощью реакции нейтрализации на белых мышах по общепринятой методике. Длительность иммунитета по отношению к сибирской язве определяли через год после вакцинации путем внутрикожного введения в область внутренней поверхности бедра оттитрованной двукратной (2 млн.) или пятикратной (5 млн.) заражающей дозы споровой культуры 76 возбудителя сибирской язвы в объеме 0,2 см³.

После вакцинации у овец не отмечали видимых признаков угнетения, снижения аппетита или других каких-либо поствакцинальных осложнений. Температура тела оставалась в пределах нормы. В течение года в хозяйстве не регистрировали случаев заболевания или гибели овец от сибирской язвы или клостридиозов.

В результате исследований было установлено, что через 25 суток после однократной вакцинации титр антитоксических антител в сыворотке крови овец всех групп был на достаточно высоком уровне, но он сохранялся не более 3-х месяцев. Известно, что при первичном введении антигена типа анатоксинов и других убитых вакцин формируют непродолжительный иммунитет, поэтому такие препараты применяют двукратно с определенным интервалом между инъекциями.

При двукратной иммунизации овец ассоциированной вакциной, а также бивалентным анатоксином титр антитоксических антител в сыворотке крови животных после ревакцинации значительно повышался. Спустя 9 месяцев после повторной вакцинации уровень антитоксических антител у таких овец был достаточным для предохранения от заболевания. Следовательно, ассоциированная вакцина против сибирской язвы и клостридиозов обеспечивает у привитых овец напряженный иммунитет по отношению к клостридиозам длительностью более 9 месяцев.

Напряженность иммунитета по отношению к сибирской язве изучали через год после иммунизации овец моновалентной вакциной против сибирской язвы из штамма 55-ВНИИВВиМ (первая группа) и ассоциированной вакциной однократно (вторая) и двукратно (третья), а также не иммунизированных против сибирской язвы (четвертая группа — контрольная) путем их заражения споровой культурой возбудителя сибирской язвы (Табл. 42).

Таблица 42.
Результаты заражения овец вирулентной культурой возбу-
дителя сибирской язвы

Группа	Вакцина	Кратность введения	Доза возбудителя, млн. спор	Число заражен-ных овец	Результаты заражения	
					пало	выжило
Первая	Моновалентная против сибирской язвы из штамма 55-ВНИИВВиМ	Однократно	2	5	0	5
			5	5	0	5
Вторая	Ассоциированная	Однократно	2	5	0	5
			5	5	0	5
Третья	Ассоциированная	Двукратно	2	5	0	5
			5	5	0	5
Четвертая (контрольная)		-	2	5	4	1
			5	5	5	0

На 3-4-е сутки после заражения 9 овец из 10 контрольных пали с признаками, характерными для сибирской язвы. У живой контрольной овцы наблюдали угнетенное состояние, отказ от корма, повышение температуры тела до 41°C на 3-4-й день после заражения. В последующем эта овца выжила.

Овцы, привитые год назад моновалентной и ассоциированной вакцинами однократно или двукратно, остались живы, видимой реакции на заражение не регистрировали. Эти данные свидетельствуют о высокой иммуногенной активности ассоциированной вакцины по отношению к сибирской язве.

Следовательно, ассоциированная вакцина против сибирской язвы и клостридиозов предохраняет привитых овец от заболевания инфекционной энтеротоксемией и анаэробной дизентерией более 9 месяцев (при двукратной вакцинации), а от сибирской язвы – более одного года (при одно- и двукратной вакцинации).

Таким образом, резюмируя вышеизложенное, можно отметить, что большинство используемых в ветеринарной и медицинской практике сибиреязвенных (антракс) вакцинных препаратов получены классическими способами аттенуации вирулентных штаммов с помощью многократных и длительных пассажей микроба на питательных средах с селекцией клонов, наследственно утративших капсулу (П.Н.Бургасов, Г.И.Рожков, 1984; В.А.Гаврилов и др., 1998). Эти, а также другие традиционные методы не утратили ценности, однако для решения актуальной проблемы создания вакцинных штаммов третьего поколения требуются новые методические подходы, соответствующие современным достижениям биологической науки.

Разрабатываемые сегодня направления по созданию сибиреязвенных вакцин нового поколения связаны с получением рекомбинантных штаммов – суперпродуцентов протективного антигена и ареактогенных, но высокоиммуногенных вакцин, обеспечивающих формирование более длительного иммунитета. Успехи, достигнутые в молекулярной биологии и адъювантной технологии, позволяют применить для этой цели новые подходы: введение детерминант РА в персистирующие формы бактерий, в лечебные и беспротеазные штаммы рода *Bacillus*; конструирование химической вакцины с использованием новых адъювантов способствует получению более эффективных вакцинных препаратов, обеспечивающих полную защиту. Вероятно, в более отдаленной перспективе новые направления будут связаны с геновакцинацией, а также созданием вакцин на основе рекомбинантных ДНК. Результаты последних достижений белковой инженерии создают благоприятные условия для конструирования модифицированных белковых молекул с тандемно дублированными эпитопами РА и производных РА, способными формировать мультимерную структуру белка, что существенно повысит его иммуногенные свойства (N.Vasilyev, E.Pimenov et al., 1998).

8. НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА И ПРИМЕНЕНИЯ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

8.1 Особенности культивирования сибиреязвенных вакцинных штаммов

Технология изготовления сибиреязвенных вакцин основана на получении споровой бакмассы (основы вакцины) на плотной среде с питательной основой из мясного кислотного гидролизата (Ю.Ф.Борисович, Л.В.Кириллов, 1981), из гидролизата кильки, а также из экстракта картофеля и пептона (В.А.Гаврилов, 1988).

Приводим краткое описание технологии изготовления вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ. Питательный агар расплавляют и заливают в трехлитровые бутылки (четверти) по 300-500 см³ в каждую (на 1-2 млн. доз вакцины используют 200-300 бутылей), стерилизуют в автоклаве, обкатывают на роллерной установке с охлаждением для равномерного наслоения агара на стенки бутылки, затем выдерживают в термальной комнате одни сутки для проверки на стерильность.

Из производственного штамма 55-ВНИИВВиМ получают расплодку путем выращивания ее в мясо-пептонном бульоне. 20-часовую культуру (расплодку) засевают в бутылки на питательный агар. Инкубируют при 34-35°C. Через 3-4 суток выросшую на агаре культуру выборочно исследуют на полноценность спорообразования микроскопией мазков. К этому времени обнаруживается 90-100% полноценных спор. Все бутылки просматривают макроскопически на чистоту и типичность роста. Затем проводят смыв культуры стерильным физиологическим раствором или дистиллированной водой по 200 см³ на каждую бутылку. Споровую культуру отсасывают закрытым способом в стерильные бутылки со стеклянными бусами через сифон с марлевым фильтром и помещают в холодильник при 2-4°C. Через 8-12 суток надсадок из бутылей декантируют, а полученную споровую биомассу подвергают контролю на контаминацию бактериальной и грибной микрофлорой, массовую долю спор, содержание жизнеспособных спор, типичность роста, однородность колоний, морфологию культуры и ее подвижность.

После контроля биомассу используют в качестве сырья для изготовления вакцины против сибирской язвы животных.

203
При этой технологии
вручную, а процесс является
уровнем механизации. У
стороны и с точки зрения
стве сибиреязвенных вак
ток, они на поверхности вак
ную культуру. Клетки в
Нижний их слой контакти
тательные вещества и рас
ступления питательных в
рулировать. Таким образо
ее размножается, часть
по межклеточным простр
ства, и некоторые споры
этих условиях происходя
к накоплению в популяц
если такие мутанты хара
повышенной жизнеспосо
мами. Процесс постепен
форм более приспособле
текает без участия специ
У возбудителя сибир
жит фазовая диссоциаци
тие на 10²-10³ клеток) п
форму. Эти формы возбу
ной стенки, по многим ф
в том числе по виру
И.И.Белоконов, 1974; И
Поэтому с целью ул
исключения условий дл
нии, а также повышения
разработать новую техн
рование вакцинных шт
акторах (суспензионны
Культивирование в
по полному циклу (сп
но со значительными т
туральной среде, созда
цессы не только прора
ния вегетативных кле
зования.

При этой технологии практически все операции выполняются вручную, а процесс является весьма трудоемким и обладает низким уровнем механизации. У такой технологии имеются отрицательные стороны и с точки зрения биологии. При промышленном производстве сибиреязвенных вакцин образуются огромные популяции клеток, они на поверхности питательного агара формируют многослойную культуру. Клетки в ней находятся не в одинаковых условиях. Нижний их слой контактирует с агаром, получает необходимые питательные вещества и растет. Верхний слой, в силу отсутствия поступления питательных веществ, заканчивает рост и начинает спорулировать. Таким образом, культура является несинхронной: часть ее размножается, часть — спорулирует. К образовавшимся спорам по межклеточным пространствам могут попасть питательные вещества, и некоторые споры вновь прорастают в вегетативные клетки. В этих условиях происходят спонтанные мутации, которые приводят к накоплению в популяции мутантных форм, особенно в том случае, если такие мутанты характеризуются большей скоростью роста и повышенной жизнеспособностью по сравнению с исходными формами. Процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм более приспособленными, так называемая автоселекция, протекает без участия специалиста, а часто и вопреки его планам.

У возбудителя сибирской язвы показательным примером служит фазовая диссоциация, представляющая собой частый (1 событие на 10^2 - 10^3 клеток) переход колоний трех форм из R- в O- и S-форму. Эти формы возбудителя различаются по структуре клеточной стенки, по многим физиологическим и биохимическим свойствам, в том числе по вирулентности и иммуногенности (Г.В. Дунаев, И.И. Белоконов, 1974; И.Р. Юсупов, 1984; Н.Г. Ипатенко и др., 1996).

Поэтому с целью улучшения качества сибиреязвенных вакцин, исключения условий для фазовой диссоциации при их изготовлении, а также повышения механизации производства необходимо было разработать новую технологию, в основе которой лежит культивирование вакцинных штаммов в жидкой питательной среде в биореакторах (суспензионным способом).

Культивирование возбудителя сибирской язвы в биореакторах по полному циклу (спора — вегетативная клетка — спора) сопряжено со значительными трудностями. Необходимо в реакторе, в культуральной среде, создать условия, при которых происходили бы процессы не только прорастания спор посевного материала и накопления вегетативных клеток, но и их полного синхронного спорообразования.

Одним из главных факторов, влияющих на процесс культивирования возбудителя сибирской язвы в биореакторах, является состав питательной среды.

Возбудитель сибирской язвы относительно нетребователен к условиям питания и хорошо растет на плотных и жидких питательных средах животного и растительного происхождения, в частности, на универсальных средах (мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, мясо-пептонный желатин, молоко, картофель) (С.Г. Колесов, 1976), а также на растительных субстратах: экстракте гороха, сои, вики, ломтиках вареной свеклы, моркови и т.д. (Н.Г. Ипатенко и др. 1987).

Пластическими и энергетическими элементами в питательных средах являются азотистые и углеводные вещества, а также фосфор и сера. Натрий, кальций, калий и магний регулируют энергетический обмен. Марганец, магний, железо, медь, цинк, кобальт и др. регулируют процессы окисления-восстановления. Все указанные минеральные вещества в необходимых количествах содержатся в животных и растительных средах (П.Н.Бургасов и Г.И.Рожков, 1984).

Bac. anthracis растет и на синтетических средах. Впервые синтетическую среду для культивирования *Bac. anthracis* разработал I. Gladstone (1939). В ее состав входили 17 аминокислот, глутамин, глюкоза, витамин В₁ (тиамин) и неорганические соли. Автор показал, что из этих 17 аминокислот абсолютно необходимы три — это лейцин, валин и изолейцин. При исключении их из среды рост возбудителя прекращался.

С. Brewer (1946) и другие на синтетической среде I. Gladstone роста сибиреязвенной культуры штамма Vollum не получили. Они разработали новую синтетическую среду, состоящую из 18 аминокислот, урацила, аденина, гуанина, тиамина, глюкозы, глутамина, бикарбоната и солей. Авторы установили, что *Bac. anthracis* нуждается лишь в тиамине; урацил, аденин и гуанин являются стимуляторами роста. Смесь из 18 аминокислот, количественное содержание которых было близко к гидролизату казеина, обеспечивало наилучший рост культуры — более $1 \cdot 10^9$ жизнеспособных спор в 1 мл.

C. Brewer (1946), C. Thorne et al. (1953) показали, что из 18 аминокислот среды только три абсолютно необходимы для роста двух вирулентных и одного авирулентного штаммов. Это — лейцин, валин и метионин. Бациллы не росли при отсутствии в среде одной из этих аминокислот.

G.Wright et al. (1954), базируясь на результатах исследований C.Brewer (1946) и C.Thorne (1953), сконструировали новую химическую среду № 528, содержащую 18 аминокислот, аденин, гуанин, урацил, тиамин, глюкозу и неорганические соли. На этой среде культура вирулентного штамма Vollum хорошо развивалась. M.Puziss и G.Wright (1954) показали, что серин и валин абсолютно необходимы для роста штамма Vollum и его мутантов. Исключение этих аминокислот из среды сопровождалось полным ингибированием роста.

О.Н.Лопаткин и др. (1974), изучая питательные потребности трех вирулентных штаммов, установили, что для их роста абсолютно необходимы лейцин, валин, метионин, пролин, треонин и серин. В работах Э.Г.Мостова и др. (1982) абсолютно необходимыми оказались валин, фенилаланин и тирозин. В работах П.И.Найманова и др. (1984 и 1986) для большинства исследуемых штаммов, в том числе штамма СТИ-1, необходимо обязательное присутствие в среде валина. Были также штаммы, растущие с глутаминовой кислотой или триптофаном. Часть штаммов полиауксотрофна по следующим аминокислотам: валин, треонин, цистин и глутаминовая кислота, цистин и серин, триптофан, треонин и аспаргиновая кислота.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что возбудитель сибирской язвы является природным ауксотрофом, имеющим от 1 до 6 выраженных генетических блоков в биосинтезе аминокислот.

На основании изучения питательных потребностей *Bac.anthraxis* разными авторами было разработано несколько питательных сред, предназначенных для выращивания сибиреязвенных бацилл до споровой формы.

J.Gladstone и P.Fildes (1940) сконструировали среду для роста и спорообразования *Bac.anthraxis*, в состав которой входили гидролизат казеина 0,5%, экстракт дрожжей 1% и неорганические соли.

C.Brewer et al. (1946) предложили среду, состоящую из недорогих и коммерчески доступных компонентов — триптического перевара казеина (триптиказы) (1%), дрожжевого аутолизата (0,075%), глюкозы (0,4%) и неорганических солей. Длительное культивирование сибиреязвенных бацилл на этой среде не снижало их вирулентности, в то время как выращивание на обычном МПА приводило к снижению вирулентности возбудителя.

N.Roth et al. (1955) предложили споруляционно-ростовую среду, состоящую из гидролизата казеина с содержанием аминного азота 1,2 мг/мл, дрожжевого аутолизата 0,5%, тиамина и неорганических солей.

R. Hanson et al. (1963) разработали среду, в состав которой входил дрожжевой экстракт (0,2%), глюкоза (0,4%) и неорганические соли.

Н. Kim и Y. Goepfert (1974) испытали все вышеперечисленные среды и пришли к выводу, что либо эти среды не поддерживали хорошую споруляцию некоторых, а иногда большинства испытуемых штаммов, либо требовалась длительная инкубация до полного спорообразования. Авторы модифицировали среду R. Hanson (1963), исключив из нее глюкозу. На этой среде 16 из 17 испытанных штаммов *Bac. anthracis* завершили спорообразование через 72 часа, один штамм не спорулировал.

Б. М. Божилов и др. (1976) модифицировали питательную среду Н. Kim и Y. Goepfert (1974). Они исключили соли магния, марганца и железа и повысили концентрацию оставшихся солей. На этой среде после 48-72 часов культивирования у 9 из 12 вирулентных штаммов *Bac. anthracis* спорулировало 99% клеток, а у трех остальных штаммов степень споруляции составила лишь 1, 10 и 15%. В культуре вакцинного штамма «Ихтиман» на этой среде 100% клеток спорулировало в течение 24-48 часов инкубирования, полученные споры были иммуногенны (проверено в остром опыте на овцах) и у них не было реверсии к первоначальному уровню вирулентности.

Таким образом, в состав почти всех споруляционно-ростовых сред для культивирования сибиреязвенных бацилл входят продукты неполного распада белков, различного рода гидролизаты. Они хорошо усваиваются возбудителем сибирской язвы и полностью обеспечивают его аминокислотным и витаминным питанием. Белковые гидролизаты являются недорогим, коммерчески доступным сырьем, поддающимся стандартизации (А. С. Фоменко и др., 1981; Б. М. Раскин, 1981). В связи с этим целесообразность их использования, особенно в комбинации с дрожжевым экстрактом, в качестве питательной основы для выращивания сибиреязвенных бацилл очевидна.

Мы, разрабатывая жидкие питательные среды для промышленного культивирования вакцинного сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ, с одинаковым успехом использовали в качестве питательных основ ферментативный пептон, гидролизат казеина и гидролизат лактальбумина в комплексе с дрожжевым экстрактом, а также мясной кислотный гидролизат. В этих средах вышеуказанный штамм хорошо рос и спорулировал. Урожай спор с 1 см³ среды в конце культивирования составлял 250-350 миллионов. Данные

споры формировали только однородные шероховатые колонии R-формы, что свидетельствовало о том, что вышеуказанные питательные среды не инициировали фазовую диссоциацию культуры.

С целью большего накопления бакмассы при культивировании различных микроорганизмов в биотехнологии используются энергетические добавки в питательные среды, наиболее часто в виде глюкозы.

По нашим данным, при добавлении в питательную среду даже незначительного количества (0,2%) глюкозы накопление бакмассы при культивировании вакцинного сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ возрастало почти в два раза, но одновременно увеличивалась и продолжительность процесса роста и спорообразования в 1,5 раза. Культура при этом подвергалась фазовой диссоциации, колонии изменялись и приобретали О-форму. Иммуногенная активность полученных спор, проверенная на морских свинках, была на 50% ниже, чем спор, выращенных в аналогичной питательной среде, но без глюкозы.

В связи с изложенным мы не рекомендуем использование в составе питательных сред для выращивания сибиреязвенных бацилл продуктов гликолиза, в частности, глюкозы.

Особая роль в суспензионном культивировании сибиреязвенных бацилл принадлежит обеспечению их достаточным количеством молекулярного кислорода.

Возбудитель сибирской язвы является факультативным аэробом, который может размножаться как в присутствии, так и в отсутствии свободного кислорода. Однако в аэробных условиях размножение происходит значительно интенсивнее.

При недостаточном поступлении кислорода наступает уменьшение скорости размножения бактерий, что в свою очередь приводит к уменьшению потребления количества питательных веществ и прежде всего углеводов. В результате этого окислительные процессы сменяются окислительно-восстановительными, при которых жидкая культуральная среда из закисленного состояния в стадии наибольшего размножения бактерий переходит в щелочное. Уровень pH данной среды обычно с 7,2 в течение первых 4-6 часов снижается до 5,6, а затем поднимается до 8,5-9. Такое защелачивание культуральной среды, по-видимому, происходит в основном за счет образования аммиачного азота в результате усиленного распада белка и аминокислот. В этих условиях рост сибиреязвенных бацилл прекращается, и спорообразования не происходит.

При слишком интенсивной аэрации размножение сибиреязвенных бацилл, как и всех аэробных бактерий, замедляется и прекращается. С.Перт (1978) указывает, что для каждого микроорганизма характерна определенная концентрация растворенного кислорода, выше которой кислород становится токсичным и подавляет его рост. Такая ситуация может возникнуть и в реакторах промышленного типа, особенно при избыточном давлении воздуха.

Культурам возбудителя сибирской язвы, содержащим менее 10^8 клеток в 1 см^3 среды, для аэробного размножения (но не для спорообразования) достаточно кислорода воздуха, растворенного в жидкой питательной среде. Поскольку растворимость кислорода очень мала и составляет 0,2 ммоль на 1 литр бульона при температуре 25°C , а кислород относится к числу быстро расходуемых субстратов, то для его пополнения в питательной среде используют аэрацию. При выращивании сибиреязвенных культур в жидких средах с целью завершения процесса (получения спор) культуру обязательно аэрируют. Это достигается непрерывным встряхиванием сосуда с растущей культурой или подачей сжатого воздуха в культуральную жидкость через барботер.

Аэрацию с помощью барботирования можно разделить на стадии образования и роста пузырьков газа, подъема пузырьков (движение пузырьков через слой жидкости), разрыва газовых пузырьков на поверхности жидкости. Основное значение для процесса массопередачи кислорода имеет вторая стадия аэрации (размер и количество пузырьков, время их пребывания в жидкости). При аэрации образуются пузырьки газа разных размеров. Чем больше будет мелких пузырьков в объеме, тем лучше, так как при этом возрастают площадь поверхности раздела фаз газ – жидкость и скорость насыщения жидкости кислородом. Интенсивность растворения кислорода зависит не только от величины площади поверхности раздела фаз, но и от скорости обновления этой поверхности, которая связана со временем циркуляции или жизни воздушных пузырьков.

Оценить эффективность аэрации в различных сосудах для культивирования, в том числе и в биореакторах, можно по массопередаче кислорода из воздуха в культуральную жидкость. Фундаментальной характеристикой массопередачи между газом (кислородом) и жидкостью служит объемный коэффициент массопередачи. Этот коэффициент показывает, какова скорость переноса молекул кислорода из газовой фазы в жидкую при заданной разности концентраций кислорода между двумя фазами. Объемный коэффициент массопередачи зависит от характеристик аппарата (биореактора) и

209
среды культиви
меняется при вы
чения. Это объ
ми, что способс
газовой фазы.
Для опреде
абсорбции кисл
модифицирован
жит окисление
качестве катали
объемом раство
фита с помощью
данным расщип
коэффициент м
лиграммах мол
Аэрация кул
ции транспорта
газообразных п
углерода, а так
мешивание, в с
нию бакмассы
щихся в процес
следовательно,
тельной интенс
При аэриро
серьезной проб
зованием на ес
как известно, с
веществ (ПАВ)
ства содержатс
ляют собой пр
правило, ПАВ
ровки. Заряже
в водной фазе,
фазу. Это при
воздух. Встраи
но удлиняют в
Пенный сло
ет двойное зн
микроорганизм
надлежит воз

среды культивирования (Н.С.Егоров и др., 1987). Он существенно меняется при внесении в среду биообъекта, обычно в сторону увеличения. Это объясняется активным поглощением кислорода клетками, что способствует поступлению его новых порций в жидкость из газовой фазы.

Для определения этого коэффициента мы использовали метод абсорбции кислорода сульфитными растворами, сульфитный метод, модифицированный Ю.В.Числовым и др. (1983). В его основе лежит окисление сульфита в сульфат в присутствии ионов меди в качестве катализатора. Объем кислорода, поглощенного известным объемом раствора сульфита, определяли путем оттитровывания сульфита с помощью раствора йода до и после аэрации. По полученным данным рассчитывали скорость растворения кислорода (объемный коэффициент массопередачи), выраженную в миллимолях или миллиграммах молекулярного кислорода на 1 литр среды в 1 час.

Аэрация культуральной жидкости выполняла не только функции транспорта кислорода к клеткам, но и обеспечивала десорбцию газообразных продуктов метаболизма, в первую очередь диоксида углерода, а также перемешивание сибиреязвенной культуры. Перемешивание, в свою очередь, приводило к равномерному распределению бакмассы в реакционном объеме, дезагрегированию образующихся в процессе выращивания бактериальных конгломератов, а следовательно, увеличению числа точек роста культуры и значительной интенсификации микробиологических процессов.

При аэрировании сибиреязвенной культуры мы столкнулись с серьезной проблемой – вспениванием культуральной среды (образованием на ее поверхности слоя из пузырьков). Пенообразование, как известно, связано с наличием в среде поверхностно-активных веществ (ПАВ), к числу которых относятся белки. Белковые вещества содержатся в среде как питательные субстраты или представляют собой продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Как правило, ПАВ включают в себя как ионные, так и неионные группировки. Заряженные группы имеют сродство к воде и локализуются в водной фазе, а нейтральные выталкиваются из воды в воздушную фазу. Это придает ПАВ ориентацию на границе раздела фаз вода – воздух. Встраиваясь в стенки газовых пузырьков, ПАВ значительно удлиняют время их жизни.

Пенный слой поверх среды культивирования в биореакторе имеет двойное значение. Пена способствует росту многих аэробных микроорганизмов (Н.С.Егоров и др., 1991), к числу которых принадлежит возбудитель сибирской язвы. Внедряясь в границу разде-

ла вода — воздух, пенообразующие ПАВ стимулируют массопередачу между этими фазами, снижая затраты на перемешивание и аэрацию. Нежелательные последствия вызывает избыточное пенообразование. Оно ведет к сокращению полезного объема биореактора и выходу из строя фильтров для очистки аэрирующего воздуха, создает угрозу заражения культуры посторонней микрофлорой и загрязнения окружающей среды. Поэтому необходимой составной частью биореактора является система пеногашения, которая служит для подавления пенообразования. Для разрушения пены применяют различные методы, но наиболее перспективным является физико-химический метод с использованием синтетических пеногасителей, например, олеиновой кислоты. Суть метода состоит в том, что пеногаситель, будучи более поверхностно-активным веществом, чем вещество пенообразователя, вытесняет последний из поверхностного слоя пены. При этом толщина стенок пузырьков пены под действием молекул синтетического пеногасителя постепенно уменьшается и они лопаются (Н.Н.Смирнов, 1987).

Мы испытали пять веществ в качестве антивспенивателя: олеиновую кислоту, полипропиленгликоль с молекулярной массой 425, а также разработанные и изготавливаемые во ВНИИ защиты животных (г.Владимир) КВМ-ДК, КЭ-12 и КВМ-ДВ. Наиболее эффективными в убывающем порядке оказались КВМ-ДК, КЭ-12 и КВМ-ДВ в конечной концентрации соответственно 0,001%, 0,002% и 0,008%. Они не обладали каким-либо отрицательным действием на рост и спорообразование культуры вакцинного сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ в применяемой концентрации. В дальнейшем мы эти пеногасители с успехом использовали при промышленном культивировании вакцинного сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ.

По данным литературы (G.Foster, G.Perry, 1954; N.Roth et al., 1955), для споруляции растущей антракс культуры необходима аэрация 6-12 ммоль кислорода на 1 л среды в 1 час.

По результатам наших экспериментов, для спорообразования 8 вакцинных сибиреязвенных штаммов (СТИ-1, Шуя-15, 34F₂, Ихтиман, № 3-R Тамарина, Ланге-I, Ланге-II и П₂R) в суспензионной культуре необходим уровень аэрации 8 ммоль кислорода на 1 литр среды в 1 час, т.е. наши результаты соответствовали литературным данным.

Мы провели серию экспериментов по суспензионному культивированию вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ в той же среде, что и предыдущие 8 штаммов. Однако при данной аэрации урожай спор и процент спорообразования были невысокими. Мы предположили,

211
что интенсивность
является оптимальной
ВНИИВВиМ и в х
оптимизации режима
10, 8, 6, 4, 3 и 2 ммоль
В результате эк
котором культура
лировала в разработ
жевого экстракта, а
составил 3,6 ммоль
вании аэрации с др
происходило резкое
тельное уменьшение
Оптимальный д
аэрации (3,6 ммоль
вышеупомянутых
О₂ л/час). Этот ф
дующим образом.
тивным аэробом, с
дыхания. В макро
ных условиях, в по
значительное влия
чески сложилось т
теля сибирской яз
тивными системам
ных реакций. Мы
по потреблению м
значительно больш
В пользу нашего
G.Goerfert (1974)
авторы культивир
язвенных штаммо
культивирования
ном культивиров
ных средах при с
молекулярном к
ных штаммов.
Значительная
язвенных бацилл
шинства патоген
инкубирования я

что интенсивность аэрации 8 ммолей кислорода на 1 л в 1 час не является оптимальной для суспензионной культуры штамма 55-ВНИИВВиМ и в дальнейшем провели серию экспериментов по оптимизации режима аэрации, используя различные ее уровни в 12, 10, 8, 6, 4, 3 и 2 ммолей кислорода на 1 л в 1 час.

В результате экспериментов мы установили уровень аэрации, при котором культура штамма 55-ВНИИВВиМ хорошо росла и спорулировала в разработанных нами средах на основе пептона и дрожжевого экстракта, а также мясного кислотного гидролизата — он составил 3,6 ммолей кислорода на 1 л среды в 1 час. При использовании аэрации с другой интенсивностью (большей или меньшей) происходило резкое снижение процента спорообразования и значительное уменьшение урожая спор, вплоть до полного его отсутствия.

Оптимальный для культуры штамма 55-ВНИИВВиМ уровень аэрации (3,6 ммолей O_2 · л/час) оказался в 2,2 раза ниже, чем у вышеупомянутых других вакцинных штаммов (8 ммолей O_2 · л/час). Этот феномен предположительно можно объяснить следующим образом. Возбудитель сибирской язвы является факультативным аэробом, ему присущ как аэробный, так и анаэробный тип дыхания. В макроорганизме этот патоген размножается в анаэробных условиях, в почве — в аэробных, т.е. среда обитания оказывает значительное влияние на характер дыхания. Видимо, филогенетически сложилось так, что в природе образовались группы возбудителя сибирской язвы, которые отличаются друг от друга ферментативными системами и интенсивностью окислительно-восстановительных реакций. Мы пока выявили 2 группы штаммов, различающихся по потреблению молекулярного кислорода, но не исключено, что их значительно больше.

В пользу нашего предположения свидетельствуют работы Н. Kim, G. Goepfert (1974), а также Б.М. Божилова и др. (1979), в которых авторы культивировали в одинаковых условиях несколько сибиреязвенных штаммов, но не все штаммы образовывали споры в конце культивирования. Штаммы, не образовавшие спор при суспензионном культивировании, хорошо спорулировали на плотных питательных средах при свободном доступе кислорода, т.е. их потребности в молекулярном кислороде были выше, чем у остальных исследованных штаммов.

Значительная роль в суспензионном культивировании сибиреязвенных бацилл принадлежит температурному режиму. Для большинства патогенных микроорганизмов оптимальной температурой инкубирования является температура тела макроорганизма, т.е. при-

мерно 37°C. Поскольку возбудитель сибирской язвы относится к ним, то мы использовали эту температуру в наших экспериментах. При снижении температуры инкубирования до 32°C происходило замедление роста и спорообразования штамма 55-ВНИИВВиМ на 3-4 часа, при увеличении ее до 39°C происходило угнетение споруляционного процесса. Количество спорулирующих клеток уменьшалось на 30-40%.

Высокие температуры порядка 42-43°C подавляют репликацию плазмид и способствуют их элиминации (Y.Ucida et al., 1985). Плазмида рХ01 детерминирует образование протективного антигена сибиреязвенной клеткой, благодаря которому в основном в макроорганизме происходит формирование иммунитета, и ее утрата в значительной мере снижает иммуногенные свойства вакцинной культуры. Так, элиминация этой плазмиды из антракс культуры снижала ее способность продуцировать протективный антиген примерно в 2500 раз (B.Green et al., 1985; M.Vodkin, S.Leppla, 1983).

В связи с изложенным температура $37 \pm 1^\circ\text{C}$ является оптимальной для инкубирования сибиреязвенных бацилл.

Посевной материал также имеет немаловажное значение в процессе суспензионного культивирования сибиреязвенных бактерий. Он может быть в двух формах – вегетативной и споровой. Посевной материал в вегетативной форме имеет ряд недостатков. Его нельзя готовить впрок, невозможно длительно хранить, так как при этом происходит отмирание части популяции. Обычно вегетативный посевной материал используют сразу после приготовления. В этом случае не будет гарантии его чистоты, потому что проверка на чистоту длится в течение 10 суток.

Этих недостатков лишен посевной материал в споровой форме. Мы проверили возможность его использования для культивирования штамма 55-ВНИИВВиМ суспензионным способом. Нами установлено, что споры вышеуказанного штамма быстро прорастают в разработанных споруляционно-ростовых средах и споровый посевной материал штамма 55-ВНИИВВиМ можно с успехом использовать в производстве сибиреязвенной вакцины.

По данным литературы, количество посевного материала, используемого обычно в биотехнологических процессах, составляет 5% от бакмассы, получаемой по окончании культивирования.

Предполагая получение урожая спор в культуре штамма в пределах 250-350 млн. с 1 см^3 среды, мы ориентировались на посевную дозу 10-15 млн. спор на 1 см^3 среды. Были проведены исследования по изучению влияния количества посевного материала в споровой форме на урожай спор и степень спорообразования культуры. Ап-

8.2. Использование для получения спор

Для промышленного суспензионным способом 250 до 1000 литров.

С этой целью верт 630 и 1000 л, предн процессов, были нам

логические реакторы В каждом реакторе типа с диаметром от мешивания среды, ала, отбора проб и для контроля темп

Система термос тельными элементами ного насоса, эл

робированы разные посевные дозы (15, 10, 4, 2, 1 и 0,5 млн. спор на 1 см³ среды).

Установлено, что при посевной дозе, равной 15, 10, 4, 2 и 1 млн. спор на 1 см³ среды, урожай спор в культуре штамма 55-ВНИИВВиМ был одинаковым и составил 250 млн. спор на 1 см³ среды при 98-99-процентном спорообразовании. При посеве 0,5 млн. спор/см³ урожай спор снижался примерно на 20%, степень спорообразования составила 95-97%. Рациональная посевная доза штамма 55-ВНИИВВиМ равнялась 1-2 млн. спор/см³.

По результатам проведенных исследований мы разработали способ суспензионного выращивания вакцинного сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ в реакторах. Способ предполагает культивирование вышеуказанного штамма в специальных споруляционно-ростовых средах на основе пептона (гидролизата казеина или гидролизата лактальбумина) в комплексе с дрожжевым экстрактом или на основе мясного кислотного гидролизата с рН 7,2-7,4 при температуре (37±1)°С, аэрации 3,6 ммоль О₂ · л/час, количестве посевного материала 1-2 млн. спор/см³, с использованием пеногасителей КВМ-ДК, или КЭ-12, или КВМ-ДВ в конечной концентрации соответственно 0,001%, 0,002% и 0,008%. Культивирование штамма проходит в течение 24 часов по полному циклу (спора – вегетативная клетка – спора). Урожай спор по окончании культивирования составляет 250-350 млн. с 1 мл среды.

8.2. Использование суспензионного культивирования для получения спорового вакцинного материала

Для промышленного производства сибиреязвенной вакцины суспензионным способом необходимо иметь биореакторы объемом от 250 до 1000 литров.

С этой целью вертикальные реакторы-смесители объемом 250, 630 и 1000 л, предназначенные для ведения физико-химических процессов, были нами переоборудованы в экспериментальные биологические реакторы для культивирования микроорганизмов.

В каждом реакторе были установлены: барботеры кольцевого типа с диаметром отверстий от 0,5 до 1 мм для аэрирования и перемешивания среды; пробоотборники для внесения посевного материала, отбора проб и выгрузки материала из реактора; термометры для контроля температуры.

Система термостатирования состояла из бачка с термонагревательными элементами и электроконтактным термометром, водоструйного насоса, электронного моста, регистрирующего и записывающе-

го температуру в реакторе, а также установленных в реакторе термометра сопротивления платинового и термометра электроконтактного.

Система обеспечения очистки, стерилизации и мерной подачи воздуха состояла из компрессора, маслоуловителя, рессивера, редуктора, ротаметра, воздухопроводов и фильтров очистки и стерилизации воздуха.

Поскольку была использована автономная система воздуховоснабжения, а из компрессора имела место утечка масла, мы установили специально оборудованный маслоуловитель. Он представляет собой двустенный вертикальный сосуд, в рубашке которого циркулирует холодная вода, а на внутренней стенке расположены отбойники, ударяясь о которые частицы масла конденсируются на них и стекают вниз — через запорный клапан наружу в емкость. Очищенный от масла воздух поступает в рессивер, затем через редуктор и ротаметр — на стерилизуемый воздухофильтр дополнительной очистки с фильтрующим элементом из тонковолокнистой стекловаты. После этого — на стерилизуемый воздухофильтр тонкой очистки (стерилизации) с фильтрующим элементом из пористого титана, потом — через барботер в питательную среду.

Выходящий из реактора воздух проходит тонкую очистку через стерилизуемый воздухофильтр (пористый титан) и через фильтр Лайк и поступает в вытяжную вентиляционную систему.

В качестве запорной арматуры в обвязке реакторов мы использовали стерилизуемые острым паром мембранные клапаны, разработанные во ВНИИТИБП. Это позволило выполнить обвязку жесткой и решить многие вопросы, связанные со стерилизацией, например, стерилизовать острым паром воздухофильтры, воздухопроводы и запорную арматуру, в том числе и на пробоотборнике. Перегретый пар, подходящий на стерилизацию вышеупомянутых объектов, подвергался очистке на паровых фильтрах с фильтрующими элементами из пористого титана.

В экспериментальных биореакторах необходимо было изучить массообменные характеристики по кислороду. С этой целью мы использовали химический (сульфитный) метод Купера в нашей модификации. Выбор химического метода не случаен. Хотя он несколько трудоемок, однако для его выполнения не нужна специальная аппаратура и оборудование. Мы планировали применить сульфитный метод и для изучения массообмена по кислороду в реакторах на биопредприятиях, где будет осуществляться изготовление сибиреязвенной вакцины. Поскольку биопредприятия в основном

Объем реактора (л)
Заполнение реактора
250/160
630/400
630/100
1000/200

По полученным
ции по СПК в люб
воздуха с известной
при известной инт
Использовав по
тирования, указ
реакторах объем
споруляционно-ро
ния (спора — вег
сибиреязвенно

не располагают специальной аппаратурой и оборудованием для определения массообмена по кислороду физическими методами, то химический метод в этом случае наиболее целесообразен для использования.

Применив сульфитный метод, мы определили в экспериментальных биореакторах скорость поглощения кислорода (СПК) при различной подаче воздуха. СПК характеризует интенсивность аэрации и выражается в миллимолях или миллиграммах растворенного кислорода на 1 л воды в 1 час (Табл. 43). По результатам измерений СПК построили для каждого реактора калибровочные графики, отражающие зависимость интенсивности аэрации от скорости подачи воздуха.

Таблица 43.

Результаты измерений скорости поглощения кислорода (СПК) в экспериментальных реакторах

Объем реактора (л)	Скорость подачи воздуха	n = 3 СПК	Уровень значимости
Заполнение реактора (л)	дм ³ · л · мин	Мер ± m	P
250/160	0,25	2,5±0,11	< 0,005
	0,5	5,1±0,12	< 0,001
	0,75	7,6±0,14	< 0,001
630/400	0,2	2,4±0,12	< 0,005
	0,4	5,5±0,12	< 0,001
	0,6	8,5±0,1	< 0,001
630/100	0,5	3,1±0,15	< 0,005
	0,75	6,0±0,15	< 0,001
	1,0	8,9±0,09	< 0,001
1000/200	0,14	3,6±0,12	< 0,001
	0,28	6,9±0,13	< 0,001
	0,56	11,0±0,08	< 0,001

По полученным графикам можно определить интенсивность аэрации по СПК в любом из экспериментальных реакторов при подаче воздуха с известной скоростью и, наоборот, скорость подачи воздуха при известной интенсивности аэрации.

Используя полученные графики и оптимальные условия культивирования, указанные выше, мы в различных экспериментальных реакторах объемом от 250 до 1000 литров в сконструированных споруляционно-ростовых средах провели полный цикл выращивания (спора – вегетативная клетка – спора) культуры вакцинного сибирезвезного штамма 55-ВНИИВВиМ.

Культивирование штамма с аэрацией проводили в течение 18 часов. В этой культуре было хорошее накопление бакмассы и степень спорообразования составила 99%. Причем большинство спор находилось внутри вегетативных клеток. Ее инкубировали еще 6 часов без аэрации для лизирования вегетативных клеток и созревания спор. После этого культура состояла из зрелых светопреломляющих овальных спор. Вегетативного материала и посторонней микрофлоры обнаружено не было. Чистота культуры была подтверждена ее посевами на питательные среды. Содержание живых спор в 1 см³ культуры составило 270 млн/см³.

Процесс культивирования вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ проходил аналогичным образом во всех экспериментальных реакторах.

8.3. Концентрирование спор вакцинного сибиреязвенного штамма

При изготовлении живых споровых лиофилизированных вакцин против сибирской язвы для концентрирования спор применяют их осаждение путем отстаивания в естественном гравитационном поле (Ю.Ф.Борисович, Л.В.Кириллов, 1981).

Осаждение сибиреязвенных спор, полученных на плотных питательных средах и ресуспендированных в физиологическом растворе или дистиллированной воде, проходит за 8-12 суток при температуре 2-4°C. Отстоявшуюся жидкость декантируют, в осадке определяют число жизнеспособных спор и доводят его до 5 млрд/см³ путем разведения физиологическим раствором или дистиллированной водой. Таким образом проводят 2-5-кратное концентрирование спорового материала.

Осаждение сибиреязвенных спор, полученных способом суспензионного культивирования в реакторе, в естественном гравитационном поле проходит значительно дольше (более 30 суток). Это объясняется повышенной вязкостью жидкой фазы, связанной с наличием в ней белкового субстрата — продуктов метаболизма и лизиса бактериальных клеток и неutilизованных компонентов питательной среды. В данном случае в таком виде этот метод концентрирования использовать нецелесообразно, хотя в отношении технологичности он является наиболее простым среди существующих методов, не требует специального оборудования и позволяет отделить споры от культуральной среды в стерильных условиях. Поэтому были необходимы поиски путей его интенсификации.

217
В литературе есть
тельных веществ для
суспензий. Эти веществ
личивают плотность а
угля для обработки у
0,1 г/л позволяет у
ность образующегося
способствуют быстром
Введение микрогетеро
ля, магнетита, карбона
99,9% дрожжевых клет
P. Spedding, 1983).

Существенное уве
тельно, и увеличение
нием флокулянтов (А

Существуют две
ции. Первая теория
ем полимерных мост
лекулы или ионы ад
молекулярного соедин
А.А.Баран, 1987).

Вторая теория о
частиц нейтрализации
тиц за счет адсорбции
литов (J. Gregory, 19

Подавляющее бо
рости осаждения аг
тельно заряженных
ных спор, поэтому в
го катионных флок
et al., 1979), полиэт
винилпиридины (В.И
ловые эфиры АК и
ко используются п
производные (G. F
цер, Д.М.Минц,
В.Г.Попов, 1982),
альгинат натрия
Флокулянты,
микроорганизмов,
достаточно полно

В литературе есть данные о применении различных вспомогательных веществ для ускорения процесса осаждения клеточных суспензий. Эти вещества способствуют агрегации клеток или увеличивают плотность агрегатов. Так, применение активированного угля для обработки суспензий активного ила в концентрации 0,01-0,1 г/л позволяет увеличить скорость осаждения и повысить плотность образующегося осадка. Высокодисперсные частицы коалина способствуют быстрому осаждению канидоспор *Beaveria bassiana*. Введение микрогетерогенных частиц с высокой плотностью (никеля, магнетита, карбоната кальция) позволяет за 15-20 минут осадить 99,9% дрожжевых клеток в производстве этанола (M. Weeks, P. Munro, P. Spedding, 1983).

Существенное увеличение размеров агрегатов клеток, а следовательно, и увеличение скорости их осаждения, достигается добавлением флокулянтов (А.А. Баран, А.Я. Тесленко, 1990).

Существуют две наиболее распространенные теории флокуляции. Первая теория объясняет механизм флокуляции образованием полимерных мостиков между дисперсными частицами через молекулы или ионы адсорбированного (хемосорбированного) высокомолекулярного соединения (А.А. Баран, 1986; А.К. Запольский, А.А. Баран, 1987).

Вторая теория объясняет механизм флокуляции дисперсных частиц нейтрализацией или компенсацией заряда поверхности частиц за счет адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов (J. Gregory, 1975).

подавляющее большинство практических задач увеличения скорости осаждения агрегатов клеток связано с флокуляцией отрицательно заряженных дисперсий, в том числе суспензий сибиреязвенных спор, поэтому в настоящее время используется достаточно много катионных флокулянтов, таких как поливиниламин (H. Tanaka et al., 1979), полиэтиленимин (Ю.И. Вейцер, Д.М. Минц, 1984), поливинилпридины (В.Н. Кабанов, Д.К. Топчиев, 1975), трет-аминоалкиловые эфиры АК и МАК (A. Carrov, C. Luca, S. Drugan, 1985). Широко используются природные флокулянты, такие как целлюлоза и ее производные (G. Franz, 1986), крахмал и его производные (Ю.И. Вейцер, Д.М. Минц, 1984), хитин и его производные (А.Я. Тесленко, В.Г. Попов, 1982), бентонит и его производные (Н.В. Мельник, 1992), альгинат натрия (T. Lindstrom, 1976) и другие.

Флокулянты, применяемые для концентрирования суспензий микроорганизмов, помимо удовлетворения обычным требованиям — достаточно полно отделять клетки от культуральной жидкости, обес-

печивать высокую степень концентрирования при малом расходе реагента и высокие скорости оседания клеток, — должны быть еще и нетоксичными для клеток микроорганизмов, нетоксичными по отношению к животным и человеку при получении биотехнологических продуктов с их участием, быть доступными и экономически выгодными (А.А. Баран, А.Я. Тесленко, 1990), а также должны формировать осадок с обязательным условием последующего дезагрегирования микроорганизмов при их разведении физиологическим раствором или дистиллированной водой.

Для концентрирования споровой суспензии, выращенной в биореакторе, наиболее подходящим, на наш взгляд, является ее отстаивание непосредственно в реакторе с применением вспомогательных веществ (флокулянтов), последующее декантирование надосадка и получение осадка — концентрированного спорowego материала.

Разработку данного способа концентрирования мы начали с изучения действия некоторых флокулянтов на процесс осаждения спор и выбора наиболее эффективного из них.

С этой целью испытаны следующие вещества: натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (NaКМЦ), хитозан, бентонит натрия и желатин из класса природных флокулянтов и полиэтиленимин (ПЭИ) из класса синтетических катионных флокулянтов.

В качестве объекта концентрирования использовали суспензию живых спор вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ возбудителя сибирской язвы с концентрацией 270 млн. спор/см³, выращенную в экспериментальном реакторе объемом 250 литров суспензионным способом.

В результате экспериментов установлено, что флокулянты NaКМЦ в концентрации 0,2-0,3% и ПЭИ — в концентрации 0,05-0,1% способствовали быстрому осаждению спор с образованием компактного осадка, надосадок при этом был прозрачный. Хитозан, бентонит натрия и желатин оказались неэффективными. В суспензиях осаждение спор этими веществами было слабым, осадок — небольшим и рыхлым, надосадок — мутным.

Изменение концентрации спор в осаждаемых суспензиях в динамике представлено в табл. 44.

Из данных таблицы следует, что в суспензии с добавкой 0,2% NaКМЦ после одних суток отстаивания в надосадке оказалось 2,6% (7 от 270 млн/см³) спор, остальные 97,4% спор находились в осадке. Дальнейшее отстаивание (2-3 суток) практически не меняло картину.

В суспензии с добавкой 0,05% ПЭИ лишь после 4-суточного отстаивания в надосадке было 5,5% (15 от 270 млн/см³) спор, ос-

219

СИБИРСКАЯ ЯЗВА (АНТРАКС): НОВЫЕ СТРАНИЦЫ В ИЗУЧЕНИИ "СТАРой" БОЛЕЗНИ

Динамика изменения концентрации спор в осадке и надосадке при отстаивании суспензии с различными флокулянтами

Время отстаивания (суток)	Исходная	1	2	3	4	5
1						
2						
3						
4						
5						

тальные 94% - в осадке, изменяло ситуацию.

В обоих опытных

плотный осадок, а на

В контрольной

осаждения спор за 5

что подтверждено ре

тальным агаром.

Концентрация сп

выше, равнялась 270

ем NaКМЦ и ПЭИ

концентрирование с

Споровый матер

вался в гомогенную

было установлено с

ее на чашках с пит

В применяемых

токсическим дейст

ВНИИВВиМ и ла

нок, белых мышей)

Таблица 44.

Динамика концентрирования спор вакцинного сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ при их осаждении флокулянтами NaКМЦ (0,2%) и ПЭИ (0,05%)

Время отстаивания (суток)	Наименование пробы	n=3 Концентрация спор (млн/см ³)	
		надосадо́к	осадо́к
Исходная	NaКМЦ	270±16	270±16
	ПЭИ	270±16	270±16
	Контроль	270±16	270±16
1	NaКМЦ	7±0,4	9450±567
	ПЭИ	70±4,4	7600±433
	Контроль	240±14	280±17
2	NaКМЦ	5±0,3	9500±551
	ПЭИ	60±3,7	8000±464
	Контроль	240±15	280±17
3	NaКМЦ	5±0,3	9500±541
	ПЭИ	30±1,8	8500±476
	Контроль	240±14	300±19
4	ПЭИ	15±1	9000±531
	Контроль	240±14	300±20
5	ПЭИ	15±1	9000±522
	Контроль	240±14	300±20

тальные 94% - в осадке. Более длительное (5 суток) отстаивание не изменяло ситуацию.

В обоих опытных флаконах при визуальном осмотре был виден плотный осадок, а надосадо́чная жидкость была почти прозрачна.

В контрольной суспензии (без добавок) видимых признаков осаждения спор за 5 суток отстаивания не было зарегистрировано, что подтверждено результатами ее титрования на чашках с питательным агаром.

Концентрация спор в исходной суспензии, как было отмечено выше, равнялась 270 млн/см³, после их осаждения с использованием NaКМЦ и ПЭИ составила 9000-9500 млн/см³, следовательно, концентрирование спор было 33-35-кратным.

Споровый материал, находящийся в осадке, легко рессуспензировался в гомогенную суспензию, состоящую из отдельных спор, что было установлено фазово-контрастной микроскопией и титрованием ее на чашках с питательным агаром.

В применяемых концентрациях NaКМЦ и ПЭИ не обладали токсическим действием на сибиреязвенную культуру штамма 55-ВНИИВВиМ и лабораторных животных (кроликов, морских свинок, белых мышей).

Сравнительная оценка обоих препаратов показала значительное преимущество NaKMЦ по отношению к ПЭИ:

- NaKMЦ не оказывает токсического действия на макро- и микроорганизмы (Ю.И.Вейцер, Д.М.Минц, 1984), тогда как ПЭИ, обладая умеренным токсическим действием, характеризуется ярковыраженным кумулятивным эффектом (А.А.Баран, А.Я.Тесленко, 1990);

- скорость осаждения спор при использовании NaKMЦ в несколько раз выше;

- потери спор при использовании NaKMЦ значительно меньше;

- осадок спор, образовавшийся при использовании NaKMЦ, достаточно плотный, но легко дезагрегируется до одиночных спор, тогда как при использовании ПЭИ – дезагрегируется с большими усилиями;

- стоимость NaKMЦ значительно ниже.

В связи с вышеизложенным мы отдали предпочтение NaKMЦ. Эффективность использования его в производственных условиях на больших объемах (160-400 л) споровой суспензии подтвердила правильность нашего выбора.

Следующим этапом работы было изучение влияния флокулянта NaKMЦ на иммунобиологические свойства образцов концентрированного спорного материала штамма 55-ВНИИВВиМ при хранении.

В реакторе объемом 250 л за 3 цикла культивирования мы вырастили 3 суспензии спор штамма 55-ВНИИВВиМ в объеме по 160 л каждой с концентрацией 300-350 млн. спор/см³. Эти суспензии подвергли концентрированию по разработанному нами способу с использованием флокулянта NaKMЦ. В результате получили 3 концентрированные суспензии спор в объеме по 5 л с концентрацией по 10 млрд. спор/см³.

Из трех концентрированных суспензий (КС-1, 2, 3) отобрали по 1 образцу, заключили их в 30-процентный раствор глицерина и разлили по 10 см³ в пенициллиновые флаконы с резиновыми пробками, закатанными алюминиевыми колпачками, которые поместили на хранение при 4±2°C. В качестве контроля использовали спорную суспензию штамма 55-ВНИИВВиМ, сконцентрированную методом центрифугирования (без NaKMЦ).

Перед закладкой на хранение и после 12 и 24 месяцев хранения каждый образец проверили на содержание жизнеспособных спор, однородность и иммуногенную активность качественным методом на морских свинках. Результаты проверки представлены в табл. 45

221

Влияние NaKMЦ на однородность и иммуногенность

Образцы концентрированной спорной суспензии	До закладки на хранение	
	% защиты морских свинок (ЗМС)	Содержание спор (СК)
КС-1	100	0
КС-2	90	0
КС-3	100	0
Контроль (без NaKMЦ)	100	0

Из данных таблицы видно, что влияние NaKMЦ на однородность опытных образцов при (4±2)°С в течение 12 и 24 месяцев хранения, его можно использовать для концентрирования спор штамма 55-ВНИИВВиМ при из-

8.4. Усовершенствование вакцинного материала

При изготовлении вакцинной массы одной из операций является пастеризация бакмассы (вакцины) для уничтожения контаминации бактериями. В настоящее время для этого принятому методу в качестве питательных сред используются: мясо-пептонная среда (МПА), мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный экстракт, мясо-пептонный бульон, бульон в течение 10 суток в стерильной среде эта пастеризация не проводится. В данном случае необходимо хранить в холоде для сохранения чистоты. Но при этом необходимо использовать чистую суспензионную среду.

Таблица 45.

Влияние NaKMЦ на иммуногенную активность, жизнеспособность и однородность спор штамма 55-ВНИИВВиМ при хранении $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$

Образцы концентрированной суспензии	До закладки на хранение			12 месяцев хранения			24 месяца хранения		
	% защиты морских свинок (ЗМС)	% снижения концентрации спор (СКС)	% однородных колоний (ОК)	ЗМС (%)	СКС (%)	ОК (%)	ЗМС (%)	СКС (%)	ОК (%)
КС-1	100	0	100	90	0	100	90	0	100
КС-2	90	0	100	100	0	100	100	0	100
КС-3	100	0	100	100	0	100	90	0	100
Контроль (без NaKMЦ)	100	0	100	90	0	100	100	0	100

Из данных таблицы видно, что флокулянт NaKMЦ не оказывает влияния на иммуногенные свойства, жизнеспособность спор и однородность опытных образцов концентрированной суспензии при хранении при $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение двух лет (срок наблюдения); следовательно, его можно использовать для концентрирования спор штамма 55-ВНИИВВиМ при изготовлении сибиреязвенной вакцины.

8.4. Усовершенствованные методы контроля спорного вакцинного материала

При изготовлении вакцин против сибирской язвы обязательной операцией является проверка посевного материала, а также спорной бакмассы (вакцинного сырья) и готовой вакцины на отсутствие контаминации бактериальной и грибной микрофлорой. По общепринятому методу все три вида биоматериала засевают на питательные среды: мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонно-печеночный бульон (МППБ) под вазелиновым маслом, бульон и агар Сабуро и ведут наблюдение за посевами в течение 10 суток. При производстве вакцины на плотной питательной среде эта проверка вполне осуществима, но занимает много времени. В данном случае смывую с агара спорную бакмассу можно хранить в холодильнике длительное время и проверять ее на чистоту. Но при изготовлении сибиреязвенной вакцины современным суспензионным способом хранить большие объемы спорного

материала, находящегося в реакторе, при температуре 15-20°C длительное время (10 суток) нетехнологично и неэкономично, существует вероятность его контаминации и, следовательно, выбраковки.

Вначале при разработке экспресс-метода контроля чистоты мы хотели пойти по пути использования сибиреязвенного бактериофага, рассуждая следующим образом. Если на чашку Петри с 2-процентным МПА посеять вакцинный материал, а затем сибиреязвенный бактериофаг, то на месте посева обоих компонентов роста сибиреязвенной культуры не будет (ее лизирует бактериофаг), зато посторонняя аэробная и факультативно анаэробная микрофлора будет расти беспрепятственно. И если она содержится в вакцинном материале, то будет обнаружена уже через 1-2 суток.

Хотя этот метод прост в исполнении и надежен, мы были вынуждены от него отказаться в связи с тем, что при использовании сибиреязвенного бактериофага есть опасность его рассеивания во внешней среде и контаминации им вакцинного или посевного материала, что является недопустимым.

Поэтому вместо использования литической зоны, образованной бактериофагом, применяли зоны задержки роста вакцинной культуры, образуемые диффундирующими в агар с бумажных дисков антибиотиками, к которым вышеуказанная культура чувствительна.

При разработке данного метода ориентировались на то, что сибиреязвенные бациллы, в частности вакцинный штамм 55-ВНИИВВиМ, чувствительны к некоторым антибиотикам. У возможных контаминантов сибиреязвенных культур чувствительность к данным антибиотикам будет не одинаковой. Она может быть выше к одним препаратам, но ниже к другим. Исходя из этого, основой метода послужило использование зон задержки роста сибиреязвенной культуры, образующихся в градиенте концентрации антибиотиков, диффундирующих в питательный агар с бумажных дисков. При наличии в культуре возбудителя сибирской язвы посторонней микрофлоры она вырастает в зонах тех антибиотиков, к которым менее чувствительна, чем сибиреязвенная, и ее легко обнаружить.

Разработку метода мы начали с определения чувствительности вакцинного сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ к 22 антибиотикам, принадлежащим к разным классам. Проверку проводили методом диффузии антибиотиков с бумажных дисков в питательный агар, засеянный в виде газона культурой штамма. Чувствительность культуры к антибиотикам оценивали по диаметру зоны задержки роста (более 25 мм — высокочувствительна, 15-20 мм — чувствительна, 11-14 — малочувствительна).

223
В результате провед
ВНИИВВиМ является
следующим из испытани
цину, стрептомицину, ге
цину, ванкомицину, ге
Из выявленных а
ромицин, тетрацикли
налидиксовую кислот
ствовал так называем
ры, обусловленный с
тентными мутантами
кую доступность ант
тибиотики, выпускае
Карпова. Данную гр
танном методе.
Метод ускоренног
образом.
Споровой культу
биореакторе, засеваю
Сабуро по 0,3 см³ на
пределяют по поверх
впитывания суспензи
из 4-х чашек, соблю
держат антибиоти
мономицин, левоми
дывают на равном р
2 см от края чашки
температуре 37±1°C
ток. Ежедневно посе
готовят мазки, окра
давленная капля» и
стным микроскопом
В том случае, е
образуется чистая з
хности питательной
ры в виде газона,
культура не конта
Рост отдельных
роста свидетельств
сторонней микро

В результате проверки установлено, что культура штамма 55-ВНИИВВиМ является чувствительной и высокочувствительной к следующим из испытанных антибиотиков: тетрациклину, эритромицину, стрептомицину, неомицину, мономицину, канамицину, новобиоцину, ванкомицину, гентамицину, цефалотину, карбенициллину, метициллину, левомецетину и налидиксовой кислоте.

Из выявленных антибиотиков отобрали группу препаратов (эритромицин, тетрациклин, стрептомицин, мономицин, левомецетин и налидиксовую кислоту), у которых в зоне задержки роста отсутствовал так называемый «вторичный» рост сибиреязвенной культуры, обусловленный спонтанно образующимися антибиотикорезистентными мутантами. При отборе группы учитывали и коммерческую доступность антибиотиков. Бумажные диски, содержащие антибиотики, выпускает объединение «Мосмедпрепараты» им. Л.Я. Карпова. Данную группу антибиотиков использовали в разработанном методе.

Метод ускоренного контроля чистоты выполняют следующим образом.

Споровой культурой штамма 55-ВНИИВВиМ, выращенной в биореакторе, засевают 2 чашки Петри с МПА и 2 чашки – с агаром Сабура по 0,3 см³ на каждую. Посевной материал равномерно распределяют по поверхности агара путем покачивания чашек. После впитывания суспензии на поверхность засеянной среды в каждую из 4-х чашек, соблюдая стерильность, кладут бумажные диски, содержащие антибиотики: эритромицин, тетрациклин, стрептомицин, мономицин, левомецетин и налидиксовую кислоту. Диски раскладывают на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии около 2 см от края чашки. Чашки с посевом на МПА инкубируют при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$, а на агаре Сабура – $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 3-х суток. Ежедневно посевы просматривают, из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму или готовят препараты «раздавленная капля» и исследуют их под световым или фазово-контрастным микроскопом.

В том случае, если вокруг бумажных дисков с антибиотиками образуется чистая зона задержки роста, а по всей остальной поверхности питательного агара будет сплошной рост вакцинной культуры в виде газона, это свидетельствует о том, что сибиреязвенная культура не контаминирована посторонней микрофлорой.

Рост отдельных колоний или сплошной рост в зоне задержки роста свидетельствуют о загрязнении сибиреязвенной культуры посторонней микрофлорой.

Используя данный метод, мы уже через 20-24 часа обнаруживали контаминанты споровых культур штамма 55-ВНИИВВиМ – грам-отрицательные подвижные и неподвижные палочки, грамположительные палочки, стафилококки, стрептококки, сарцины. Традиционным методом мы выявляли их лишь на 3-5 сутки.

Разработанный нами метод контроля чистоты оказался эффективным и в то же время безопасным с точки зрения контаминации вакцины. Он позволяет выявить наиболее часто встречающиеся в производстве контаминанты вакцинных культур. Данный метод позволяет в 3-5 раз сократить продолжительность контроля чистоты вакцинного материала.

Изучая процесс суспензионного культивирования возбудителя сибирской язвы, мы столкнулись с явлением агрегирования споровой суспензии, полученной в реакторе. Поскольку основным методом определения концентрации жизнеспособных спор в вакцинном материале является титрование его на чашках с питательным агаром с последующим подсчетом выросших колоний, полученное этим методом число спор в агрегирующей суспензии меньше истинного, потому что каждый агрегат, состоящий из 2-5 спор, образует на агаре лишь 1 колонию, так же как и отдельная спора.

Из литературы известно, что некоторые химические вещества, в частности детергенты, соли и кислоты, способны разрушать агрегаты спор, а также предотвращать их образование. Так, Н.П.Буравцева и Е.Г.Чернявская (1986) предложили использовать в качестве разводящей жидкости при титровании сибиреязвенных спор вместо общепринятого физиологического раствора 0,05-0,1-процентный раствор твина-80. Г.И.Романов и А.А.Маничев (1986) для этой цели рекомендовали применять 0,5-процентный раствор пирофосфата натрия.

В нашей работе использовали споровую суспензию вакцинного сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ и следующие шесть растворов: физиологический раствор (контроль), 0,1-процентный раствор твина-80 фирмы «Флюка» (Швейцария), 0,1-процентный раствор твина-85 фирмы «Серва» (ФРГ), 0,5-процентный раствор пирофосфата натрия, 0,05 нормальный раствор соляной кислоты и 0,01-процентный раствор метацида.

Споровую суспензию разводили последовательно десятикратно 6-ю растворами и из 2-х последних разведений делали высеив в чашки Петри со свежеприготовленным подсушенным агаром «КД» одной серии. Для каждого разведения использовали по 3 чашки. Чашки с посевами инкубировали 18-20 часов при температуре 37°C. Под-

8.5. Иммунобиологические вакцины, изготовленные

В суспензионной ку... при оптимальных пара... дятся в одинаковых ус... плотной питательной сре... питательного субстрата... Эти экстремальные соб... рообразования, вегетат... ровую форму, и на это... тура является синхрон... спорообразование 95-1... временно.

В этом случае, в о... агара, условий для дис... читься однородной и...

Мы проверили ос... однородность, безвред... но-промышленных се... из штамма 55-ВНИИ...

В результате пров... типичных спор, форм... безвредны для кроли... рулентностью для без...

считывали выросшие на агаре колонии и по результатам подсчета определяли концентрацию спор. Эксперимент проводили в трех повторностях.

При разведении споровой суспензии физиологическим раствором (контроль) определена концентрация 140 ± 8 млн. спор/см³; 0,1-процентным раствором твина-80 – $215 \pm 12,3$ млн. спор/см³; 0,1-процентным раствором твина-85 – 176 ± 10 млн. спор/см³; 0,5-процентным раствором пирогосфата натрия – $150 \pm 8,6$ млн. спор/см³; 0,05 нормальным раствором соляной кислоты – 122 ± 7 млн. спор/см³ и 0,01-процентным раствором метацида – $97 \pm 5,5$ млн. спор/см³.

Из полученных данных видно, что наиболее эффективным дезагрегирующим раствором из проверенных был 0,1-процентный раствор твина-80. При его использовании выявлена концентрация спор в 1,5 раза большая, чем в контроле. Следовательно, данный разбавитель целесообразно использовать при определении концентрации спор в вакцинном сырье и сибиреязвенных вакцинах.

8.5. Иммунобиологические свойства сибиреязвенной вакцины, изготовленной суспензионным способом

В суспензионной культуре вакцинного сибиреязвенного штамма при оптимальных параметрах сго культивирования клетки находятся в одинаковых условиях, в отличие от клеток, растущих на плотной питательной среде. Они размножаются до истощения в среде питательного субстрата и критического накопления метаболитов. Эти экстремальные события инициируют включение процесса спорообразования, вегетативные клетки переходят в покоящуюся споровую форму, и на этом цикл культивирования завершается. Культура является синхронной, об этом свидетельствует тот факт, что спорообразование 95-100% вегетативных клеток происходит одновременно.

В этом случае, в отличие от культивирования на поверхности агара, условий для диссоциации культуры нет, и она должна получиться однородной и иммуногенной.

Мы проверили основные биологические свойства, в том числе однородность, безвредность и иммуногенность у 13 опытных и опытно-промышленных серий жидкой вакцины против сибирской язвы из штамма 55-ВНИИВВиМ, полученных в биореакторах.

В результате проверки установлено, что все серии состояли из типичных спор, формирующих только однородные колонии, были безвредны для кроликов, обладали незначительной остаточной вирулентностью для белых мышей и морских свинок, не образовывали капсулу *in vivo* и *in vitro*.

Проверку иммуногенной активности серий проводили на лабораторных и сельскохозяйственных животных (морских свинок и овцах) качественным и количественным методами.

Иммуногенность качественным методом на морских свинках определяли путем подкожного введения этим животным в область белой линии живота по 10-12,5 млн. спор вакцины (0,5 см³) и последующего подкожного заражения их через 12-14 суток после вакцинации сибиреязвенной референс-заражающей культурой штамма М-71 или 71/12 (второй вакцины Ценковского) в дозе по 1 млн. спор (0,5 см³) в области белой линии живота. По количеству выживших и павших животных определяли процент защиты в опытной и контрольной группах.

Иммуногенность количественным методом на морских свинках определяли путем их подкожной вакцинации в разных дозах (по 5 млн., 1 млн., 200 тыс. и 40 тыс. спор) и последующего подкожного заражения через 12-14 суток после прививки референс-заражающей культурой штамма М-71 или 71/12 в дозе 1 млн. спор. На основании результатов контрольного заражения рассчитывали по методу Кербера 50-процентную иммунизирующую дозу (ИмД₅₀) серии вакцины для морских свинок.

Иммуногенность качественным методом на овцах определяли путем их подкожной вакцинации в области внутренней поверхности бедра в дозе по 10-12,5 млн. спор (0,5 см³) и последующего (через 14 суток) внутрикожного заражения культурой вирулентного сибиреязвенного штамма в дозе по 1 млн. спор. По результатам контрольного заражения определяли процент защиты привитых животных.

Иммуногенность количественным методом на овцах определяли путем их подкожной вакцинации в разных дозах (по 12, 6, 1, 0,4 и 0,2 млн. спор) и последующего (через 14 суток) внутрикожного заражения культурой вирулентного штамма в дозе по 1 млн. спор. Иммунизирующую дозу (ИмД₅₀) для овец рассчитывали по методу Кербера. Результаты представлены в табл. 46.

После вакцинации опытной вакциной у некоторых морских свинок на месте введения препарата развивался поверхностный некроз. Из 12 привитых животных иногда 1-2 погибали, поэтому для иммунизации обычно берут 12 морских свинок, а для заражения используют 10 из них.

Овцы на введение опытной вакцины в большинстве случаев реагировали кратковременным (2-4-суточным) незначительным повышением температуры тела на 0,1-0,3°C.

Результаты опытных серий

Вид животного	Материал	Доза (млн. спор)	Количество животных	Количество погибших	Процент защиты
Морские свинки	Вакцина	10	10	1	90
	Контроль	10	10	10	0
Овцы	Вакцина	1	12	2	83
	Контроль	1	12	12	0

Обозначение: * - заражены

После контрольного заражения...
полной дозой вакцины (12 млн. спор) тела на 0,1-0,8°C в течение 1-2 суток общей массы не выделялись. У привитых отсутствовала и каких-либо признаков некроза. Из данных таблицы 46 видно, что однократным подкожным введением 12,5 млн. спор создают у морских свинок 96% иммунитет. Для овец сибиреязвенной вакцины высокой напряженности создаются (табл. 46).
50-процентная иммунизирующая доза составила от 30 до 70 тыс. спор. Допустимой технической вакциной для овец не прививали. У контрольных животных развивалась острая сибиреязва.

Таблица 46

Результаты определения иммуногенной активности опытных серий вакцины на морских свинках и овцах

Вид животных	Качественный метод				Количественный метод				
	Кол-во серий	Заражено привитых животных (голов)	Выжило Животных (голов)	% защиты	Кол-во серий	Прививочные дозы (млн спор)	Заражено привитых животных (голов)	% защиты	ИмД ₅₀ (тыс. спор)
Морские свинки	13	130	125	96	4	5 1 0,2 0,04	24 24 24 24	100 100 79 62	30-70
	Контроль	130	2	0	Контроль	-	24	0	-
Овцы	7	57 4*	57 4*	100 100*	4	12 6 1 0,4 0,2	16 11 16 5 8	100 82 88 20 0	650-1000
	Контроль	29	0	0	Контроль	-	17	0	-

Обозначение: * - заражены через 360 дней после вакцинации.

После контрольного заражения у половины овец из привитых полной дозой вакцины (12 млн. спор) было повышение температуры тела на 0,1-0,8°C в течение 3-7 суток. Внешне эти животные из общей массы не выделялись. У остальных овец температурная реакция отсутствовала и каких-либо отклонений от клинико-физиологического статуса не зарегистрировано.

Из данных таблицы 46 видно, что опытные серии вакцины при однократном подкожном введении в регламентированной дозе (10-12,5 млн. спор) создают у животных напряженный иммунитет, предохраняя 96% морских свинок и 100% овец от заражения вирулентными для них штаммами возбудителя сибирской язвы. Иммунитет высокой напряженности сохранялся у овец не менее 1 года (срок проверки).

50-процентная иммунизирующая доза (ИмД₅₀) для морских свинок составила от 30 до 70 тыс. спор, что в 14-33 раза меньше максимально допустимой ИмД₅₀ для морских свинок (1 млн. спор), регламентированной техническими условиями.

ИмД₅₀ для овец не превышала 1 млн. спор. Регламентированная техническими условиями прививочная доза для овец в 10-12,5 раза больше.

У контрольных (непривитых) животных после заражения развивалась острая форма сибирской язвы, которая заканчивалась ги-

белью морских свинок на 3-6 сутки, овец — на 3-7 сутки. Специфичность гибели животных от сибирской язвы подтверждали микроскопией мазков-отпечатков из крови уха, а также выделением из этой крови чистой культуры капсулообразующего сибиреязвенного микроба на МПА, МПБ и среде для капсулообразования ГКИ.

По нашим данным, иммуногенная активность жидкой вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ, изготовленной в реакторе суспензионным способом, в 2-4 раза выше, чем изготовленной на плотной среде. ИмД₅₀ «суспензионной» вакцины для морских свинок составляет 30-70 тыс. спор, а «агаровой» вакцины — 120 тыс. спор.

Мы считаем, что одной из важнейших причин, обуславливающих более высокую иммуногенную активность «суспензионной» жидкой вакцины, является наличие в ней протективного антигена. По технологии изготовления вышеуказанной вакцины споры, полученный в реакторе и находящийся в культуральной среде, разводят водно-глицериновым раствором и готовый биопрепарат расфасовывают во флаконы. Таким образом, весь протективный антиген, содержащийся в культуральной жидкости, должен сохраниться в вакцине. По технологии производства вакцины на плотной среде протективный антиген почти полностью теряется на промежуточных этапах и не содержится в готовой вакцине.

Результаты проведенных исследований подтвердили правильность нашего предположения. Определенный методом радиоиммунного анализа протективный антиген был обнаружен в культуральной среде штамма 55-ВНИИВВиМ в титре 1:125, в жидкой вакцине, приготовленной в реакторе суспензионным способом, — в титре 1:16, в аналогичной вакцине, хранившейся в течение трех лет, — в титре 1:8. В препарате, изготовленном на плотной среде, его, как и следовало ожидать, обнаружено не было. Фильтрат суспензионной культуры штамма 55-ВНИИВВиМ, не содержащий спор, создавал 40-50-процентную защиту у морских свинок от заражения вирулентной для них культурой штамма М-71 второй вакцины Ценковского.

В связи с вышеизложенным жидкая вакцина из штамма 55-ВНИИВВиМ, изготовленная суспензионным способом в реакторах, является комбинированным препаратом, состоящим из живого спорного компонента и протективного антигена, которые вместе усиливают иммунный ответ.

Ежегодна
ных животн
рое животн
рованную до
или попадан
при беспокой
тивными пос
точной нап
жу животны
ния сибиреяз
дения без же
ной проблем

При разр
тив сибирско

Перораль

вопросы с до

воздействия

поместив их

дочном, но р

ного скармли

шить доволь

сеяние во вне

Хоть он и бе

диссеминаци

В плане

сибирской яз

ученые. Н.С

тективного а

сальмонелл

эпителий ки

тез протекти

быть исполь

язвы живот

Аэрозол

обработка б

вание вакци

— обширная

возможность

Р...

8.6. Групповое применение сибиреязвенной вакцины

Ежегодная вакцинация огромного поголовья сельскохозяйственных животных является весьма трудоемким мероприятием. Каждое животное необходимо зафиксировать и ввести ему регламентированную дозу вакцины строго подкожно. Введение неполной дозы или попадание вакцины в мышечную ткань, что может случиться при беспокойном поведении прививаемых животных, чревато негативными последствиями в виде формирования иммунитета недостаточной напряженности или осложнений, приводящих иногда к падежу животных. Поэтому разработка способа группового применения сибиреязвенной вакцины с точной дозировкой и глубиной введения без жесткой фиксации прививаемых животных является важной проблемой практической ветеринарии.

При разработке способа групповой иммунизации животных против сибирской язвы мы исходили из следующих соображений:

Пероральный способ – он удобен для применения, но возникнут вопросы с дозировкой вакцины, а также с защитой спор от вредного воздействия желудочного сока. Вопрос защиты спор можно решить, поместив их в микрогранулы с оболочками, устойчивыми в желудочном, но растворяющимися в кишечном соке. Вопрос дозированного скармливания микрогранул с вакциной в условиях стада решить довольно трудно. Еще один отрицательный момент – это рассеяние во внешней среде спор вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ. Хотя он и безвреден для животных, но с точки зрения экологии его диссеминация нежелательна.

В плане перорального применения вакцины для профилактики сибирской язвы обнадеживающие результаты получили зарубежные ученые. N.Coulson et al. (1994) встроили ген сибиреязвенного протективного антигена в плазмиду *Salmonella typhimurium*. Клетки сальмонелл при пероральном применении быстро колонизировали эпителий кишечника и обеспечивали стабильность плазмиды и синтез протективного антигена. В перспективе эта конструкция может быть использована для приготовления вакцины против сибирской язвы животных для перорального применения.

Аэрозольный способ: его положительные стороны – быстрая обработка большого поголовья скота, относительно точное дозирование вакцины, небольшая трудоемкость. Отрицательные стороны – обширная диссеминация вакцинного штамма во внешней среде, возможность аллергизации обслуживающего персонала.

Внутрикожный способ вакцинации с помощью безыгольных инъекторов. Еще А.М.Безредка (1929) установил высокую иммуно-

логическую эффективность этого способа и его некоторые преимущества перед подкожным введением препарата. Однако проводить внутрикожную вакцинацию шприцем с иглой очень трудоемко, поэтому способ не нашел применения в ветеринарной практике. Но в современных условиях ветеринарные специалисты вооружены безыгольными инъекторами, что позволяет увеличить производительность их труда. Его положительными сторонами помимо иммунологической эффективности являются точность дозировки вакцины, отсутствие необходимости жесткой фиксации животного и исключение возможности перезаражения животных.

В связи с вышеизложенным внутрикожный способ вакцинации с помощью безыгольных инъекторов на данном этапе представляется наиболее перспективным по сравнению с другими способами.

Для его разработки необходимо было решить следующие задачи:

- определить место внутрикожного инъецирования сибиреязвенной вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ у основных видов сельскохозяйственных животных: крупного рогатого скота, овец и свиней;
- изучить реактогенные свойства сибиреязвенной вакцины при внутрикожном применении;
- определить напряженность и длительность иммунитета у крупного рогатого скота, овец и свиней после внутрикожного введения вакцины.

В экспериментах использовали телят черно-пестрой породы старше трех месяцев массой 70-80 кг — 19 голов; овец породы прекос старше трех месяцев массой 18-35 кг — 39 голов; свиней массой 28-35 кг — 23 головы. Животных вакцинировали концентрированной сибиреязвенной вакциной из штамма 55-ВНИИВВиМ, изготовленной в реакторе объемом 250 л суспензионным способом.

Вакцину вводили внутрикожно безыгольным инъектором БИ-7 «Овод» телятам в дозе 20-25 млн. спор в объеме 0,2 см³ в области промежности и средней трети шеи; овцам — в дозе 10-12 млн. спор в объеме 0,1 см³ в области подхвостового зеркала и лопатки; свиньям — в дозе 20-25 млн. спор в объеме 0,2 см³ в ямку за ухом и у основания дорсальной поверхности уха.

Вакцинацию во всех случаях проводили однократно. Из подопытных животных сформировали группы.

Для контрольного заражения подопытных животных использовали культуру вирулентного сибиреязвенного штамма. Животных заражали через 14 дней после прививки, а нескольких овец — через 360 дней.

Крупный рогатый скот заражали перорально, овец — внутрикожно, свиней — подкожно в дозах 200 млн., 1 млн. и 100 млн. соответственно.

Обобщенные результаты исследований представлены в табл. 47.

Результаты экспериментов на крупном рогатом скоте. Повышения температуры тела у животных после внутрикожного введения вакцины зарегистрировано не было. Наличия отеков и некрозов на месте введения препарата не обнаружено. Это свидетельствует о слабой реактогенности концентрированной сибиреязвенной вакцины.

В группах телят, привитых в область промежности (7 голов) и среднюю треть шеи (4 головы), после контрольного заражения каких-либо отклонений от клинико-физиологического статуса не обнаружено, все животные остались живы.

В группе непривитых (контрольных) животных (8 голов) телята пали на 5-6 сутки после заражения. За сутки до гибели температура тела животных повышалась на $1,5^{\circ}\text{C}$.

Трупы были вздуты, трупное окоченение отсутствовало, конечности вытянуты, слизистые оболочки цианотичны с точечными кровоизлияниями. Истечения из естественных отверстий отсутствовали. Специфичность гибели животных подтверждена обнаружением в крови трупов из периферических сосудов (уха) капсулообразующих бацилл и выделением из нее чистой культуры капсулообразующего штамма возбудителя сибирской язвы на питательных средах.

Оба места введения вакцины оказались подходящими, но наиболее удобным является место в области промежности с точки зрения безопасности для оператора, кроме того, в этом месте нет необходимости депилировать кожу.

Результаты экспериментов на овцах. Повышение температуры тела после введения вакцины было лишь у 3-х из 31-й овцы, оно было незначительным (выше нормы на $0,1-0,8^{\circ}\text{C}$) и кратковременным (1 сутки). У остальных овец физиологическое состояние было в пределах нормы. Отеков и некрозов на месте введения вакцины не обнаружено. Эти результаты свидетельствуют о слабой реактогенности вакцины.

В группах овец, привитых внутрикожно в подхвостовое зеркало (11 голов) и область лопатки (6 голов), в результате контрольного заражения, проведенного через 14 суток после иммунизации, лишь у одной овцы было незначительное и кратковременное повышение температуры. У остальных овец видимых отклонений от клинико-физиологического статуса не обнаружено. Все животные остались живы.

Таблица 47.

Определение реактогенности концентрированной сибиреязвенной вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ и устойчивости к заражению у привитых ею внутрикожно телят, овец и свиней

Вид животных	№ групп	Количество	Место введения вакцины, доза (млн спор)	Температурная реакция на вакцину выше нормы	Результаты заражения			
					Температурная реакция выше нормы	Пало, голов	Выжило, голов	% защиты
Телята	1	7	Область промежности, 25	отсутствует	Отсутствует	0	7	100
	2	4	Средняя треть шеи, 25	отсутствует	Отсутствует	0	4	100
	3	8	Непривитые	контроль	у 8 телят 39,6 - 41,4°C в течение 2-5 сут	8	0	0
Овцы	1	11 14*	Подхвостовое зеркало, 12,5	у 2 овец 40,1°C в течение 1 сут	у 1* овцы 40,4 - 41,8°C в течение 3-х суток	0 0*	11 14*	100 100*
	2	6	Область лопатки, 12,5	у 1 овцы 40,8°C в течение 1 сут	у 1 овцы 40,9°C в течение 1 сут	0	6	100
	3	8	Непривитые	контроль	У 8 овец 41,1 - 41,8°C в течение 2-3 сут	8	0	0
Свиньи	1	10	Ямка за ухом, 25	у 3 свиней 40,1-40,5°C в течение 1-2 сут	у 3 свиней 40,1-40,7°C в течение 1-2 сут	0	10	100
	2	4	У основания дорсальной поверхности уха, 25	у 2 свиней 40,1-40,3°C в течение 1-2 сут	у 2 свиней 40,1-41,3°C в течение 1-2 сут	0	4	100
	3	9	Непривитые	контроль	у 9 свиней 41,0-42,0°C в течение 5-6 сут	0	9	100

Примечание: * - заражены через 360 дней после иммунизации.

В группе овец, привитых внутрикожно в подхвостовое зеркало (14 голов) и подвергнутых контрольному заражению через 360 дней после иммунизации, лишь у одной овцы было повышение температуры тела на 0,4-1,8°C в течение трех суток. Животное было несколько угнетено, наблюдалось снижение аппетита и жажда. На 4 сутки температура нормализовалась, аппетит восстановился. У остальных животных видимых отклонений от физиологической нормы зарегистрировано не было. Все животные остались живы.

В группе контрольных животных все 8 овец пали на 4-5 сутки после заражения. Трупы животных были вздуты, трупное окоченение отсутствовало, видимые слизистые оболочки цианотичны, из естественных отверстий вытекала кровянистая жидкость. Специфич-

ность гибели овец от сибирской язвы подтверждена микробиологическими исследованиями крови трупов.

Из двух испытанных мест инокуляции вакцины оба являются подходящими, но наиболее удобным мы считаем область подхвостового зеркала, так как в этом случае «выстрел» вакцины из безыгольного инъектора легко осуществляется на стоящем животном, тогда как при инъекции в область лопатки это сделать затруднительно и овец приходится прививать в лежачем положении.

Результаты экспериментов на свиньях. У 5 свиней из 14, привитых вакциной внутрикожно, зарегистрировали незначительное повышение температуры тела (на $0,1-0,5^{\circ}\text{C}$) в течение 1-3 суток. У остальных животных физиологическое состояние было в пределах нормы. На месте введения биопрепарата отеков и некрозов не обнаружено. Результаты вакцинации свидетельствуют о слабой реактогенности вакцины.

В группе свиней, привитых внутрикожно и подвергнутых контрольному заражению, у 5 животных из 14 отмечали кратковременное (1-2 суток) повышение температуры на $0,1-1,3^{\circ}\text{C}$. У остальных животных видимых отклонений от физиологической нормы зарегистрировано не было. Все животные остались живы.

В группе контрольных животных после заражения зарегистрирована подострая форма течения сибирской язвы у всех 9 свиней. На вторые сутки температура тела животных повысилась на $1-2^{\circ}\text{C}$ и удерживалась в течение 5-6 суток. В этот период отмечали отказ животных от корма, они больше лежали, щетина была взъерошена, в области подчелюстного пространства шеи и подгрудка образовывались отеки, а в месте заражения — типичная язва. Через 10 суток после заражения клинико-физиологический статус больных сибирской язвой свиней восстановился, животные выздоровели.

Из двух подходящих мест введения вакцины мы отдаем предпочтение инокуляции препарата в ямку за ухом из-за большего удобства работы с животными.

Таким образом, в результате экспериментов установлено, что внутрикожная иммунизация концентрированной сибиреязвенной вакциной из штамма 55-ВНИИВВиМ крупного рогатого скота, овец и свиней безыгольным инъектором обеспечивает формирование у 100% привитых животных напряженного противосибиреязвенного иммунитета. Все привитые животные устойчивы к контрольному заражению культурой вирулентного штамма возбудителя сибирской язвы, тогда как непривитые (контрольные) свиньи переболевают, а крупный рогатый скот и овцы погибают в 100% случаев.

Установлена слабая реактогенность концентрированной вакцины против сибирской язвы из штамма 55-ВНИИВВиМ для сельскохозяйственных животных при внутрикожном введении.

Определены наиболее удобные места инъекции вакцины: у крупного рогатого скота – область промежности, у овец – подхвостовое зеркало, у свиней – ямка за ухом.

На основании полученных результатов разработан способ внутрикожной иммунизации сельскохозяйственных животных против сибирской язвы с помощью безыгольного инъектора БИ-7 «Овод». Он в настоящее время широко используется в Российской Федерации наряду с подкожным способом и зарекомендовал себя как высокоэффективный и удобный для групповой обработки скота.

9. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ И ВЫНУЖДЕННЫХ (ПРОТИВОЭПИЗООТИЧЕСКИХ И ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ) МЕРОПРИЯТИЙ

Система профилактических и противоэпизоотических мероприятий, разработанная на научной основе и основе многовекового опыта борьбы с этой болезнью, существует в большинстве стран мира, в т.ч. в России, и она достаточно эффективна при ее продуманном применении. Ее отдельные составляющие подвергаются уточнению и изменению. Это, в частности, связано с необходимостью учитывать особенности географического положения страны, особенности ведения сельского хозяйства, животноводства, видового состава сельскохозяйственных, домашних и диких животных.

Уточняются места гибели и захоронения животных. Совершенствуются средства специфической профилактики, и в связи с этим меняются схемы иммунизации животных.

Предлагаются новые, более эффективные дезинфицирующие средства. Усиливается контроль за ввозом на территорию страны мяса и костной (мясокостной) муки. Как пишет М. Hugh-Jones (1989), «скандинавские страны фактически свободны от антракса благодаря контролю за импортом мяса и костной муки, а также правильной утилизации трупов».

В основе мероприятий в неблагополучных по сибирской язве (антраксу) странах лежит вакцинация животных и людей. Прививки проводятся как с профилактической, так и вынужденной целями. Масштабы вакцинации зависят от конкретных условий.

По данным Р. Turnbull (1989), в Великобритании используются ежегодно в последние годы около 4000 доз вакцины для прививок животным и 4000-5000 доз вакцины для иммунизации людей в зонах риска. В Индии (Р. Bhat, D. Mohan, M. Lalitha, 1989) проводят вакцинацию во время вспышек антракса. Как пишут авторы, несмотря на ежегодные интенсивные профилактические мероприятия, антракс продолжает оставаться проблемой для Индии.

В Индонезии (S. Haroljoutomo, 1989) использовали споровую вакцину из штамма *Bac. anthracis* Weybridge 34F2. Проводили профилактическую иммунизацию крупного рогатого скота, буйволов, овец и коз в энзоотических и эндемических зонах, однако объем вакцинации недостаточен.

В Намибии (H. Taeger, P. Lindeque, 1989) с введением вакцинации споровой вакциной из штамма Sterne число вспышек антракса уменьшилось.

По данным Shu Lin Dong (1989), в Китае делаются попытки полной ликвидации болезни с помощью биопрепаратов для ветеринарных целей, производство которых началось в Китае в 40-х годах. Разрабатывалась также живая вакцина для иммунизации людей из авирулентного штамма A16R.

Широкомасштабная ежегодная вакцинация животных начата с 1990 года в западной провинции Замбии (D. Dietvorst, 1996), однако вспышки антракса продолжают иметь место. Проведение мероприятий наталкивается на сопротивление фермеров, которые боятся заноса болезни с вакциной. Кроме того, фермеры возражают против прививок быков в период пахоты, т.к. животным после вакцинации требуется двухнедельный отдых. В этой местности проводится активная пропаганда пользы вакцинации. Приводится пример, когда один фермер не хотел вакцинировать свой скот. Внезапно один бык погиб. Фермер с сыном разделали тушу и привезли в деревню. Мясо сварили и съели. Через некоторое время вся семья заболела. В больнице им объяснили, что это антракс. Несмотря на лечение, старший сын умер. Заболели и другие животные в этом стаде. Ветеринары объяснили фермеру, что скот необходимо вакцинировать. Теперь этот фермер не только прививает свой скот, но и рассказывает другим жителям деревни о том, что скот нужно вакцинировать. Этот случай используется в качестве учебного материала по сибирской язве.

В ряде стран Азии также широко применяется вакцинация животных против антракса. В сообщении D. Joshi (1998) указывается, что в Бутане в связи с широким распространением антракса у животных и людей применяли споровую вакцину из штамма Weybridge 34F2. Вакцинация животных проводилась в Лаосе, Папуа Новая Гвинея (свиней), в Бангладеш, на Филиппинах, в Таиланде (использовали до 300000 доз вакцины), в Непале (использовали до 4000 доз вакцины Стерна).

В России в результате проведения постоянных противосибиреязвенных мероприятий, основой которых является регулярная массовая иммунизация животных вакциной из штамма 55-ВНИИВВиМ, достигнуто резкое снижение числа вновь возникающих сибиреязвенных очагов.

Большая работа проведена учеными разных стран по вакцинации диких животных против антракса в Национальных парках

СИБИРСКАЯ ЯЗВА
Африки. Особый ан-
цин. Впервые парен-
совом количестве др-
лов пулями или др-
ального оборудован-
Исследователями
ния, очистки и конче-
Проведены также п-
морских свинок во
цин.

Установлено инд-
ких свинок при ор-
Стерна - оральных
ральных. Вегетатив-
немедленно трансфо-
сушенных фецес сло-
следовании - свыше
ких свинок - свыше
ные парентерально,
цес.

Для того чтобы у-
ной вакцинации, опр-
вести исследования

Авторы особо по-
которых иммуногени-
вать только в эндеми-
ция соответствующи-

V. de Vos, G. Sch-
ного» метода иммун-

Крюгера (ЮАР). Ан-
шприц с гиподермал-

Позднее этот ме-
да баллистических и
форме шариков (из-
шивания).

Безопасность в
животных в лабора-

машних козах и ант-
11 различных видах
вертолета с нахо-

Африки. Особый акцент сделан на использовании оральных вакцин. Впервые парентеральную вакцинацию диких животных в массовом количестве провели более 25 лет тому назад методом выстрелов пулями или дротиками при использовании вертолетов и специального оборудования.

Исследователями ФРГ разработана технология культивирования, очистки и концентрирования препаратов (F.Gessler et al., 1996). Проведены также предварительные лабораторные испытания на морских свинках возможной опасности применения оральных вакцин.

Установлено индуцирование гуморального иммунитета у морских свинок при оральном применении препаратов спор вакцины Стерна – оральных доз требовалось в 10 раз больше, чем парентеральных. Вегетативные формы бацилл выделялись с фецес и почти немедленно трансформировались в споры. Споры выживали в высушенных фецес слонов длительное время (при лабораторном исследовании – свыше одного месяца, при высушивании фецес морских свинок – свыше одного года). Морские свинки, вакцинированные парентерально, не выделяли жизнеспособных бактерий с фецес.

Для того чтобы установить возможную сероконверсию при оральной вакцинации, определить различные приманки, необходимо провести исследования на отловленных диких животных.

Авторы особо подчеркивают, что живые вакцины, особенно те, у которых иммуногены экскретируются вакцинами, следует использовать только в эндемичных областях, где уже существует контаминация соответствующими патогенами.

V.de Vos, G.Scheepers (1998) сообщили о разработке «воздушного» метода иммунизации диких антилоп в Национальном парке Крюгера (ЮАР). Антракс-вакцину Стерна набирали в стреляющий шприц с гиподермальной иглой и выстреливали из специально изготовленного ружья. Оператор находился на борту вертолета.

Позднее этот метод усовершенствовали с использованием метода баллистических имплантантов – биопуль, содержащих вакцину в форме шариков (изготовление с помощью замораживания – высушивания).

Безопасность вакцины Стерна проверили на 14 видах диких животных в лабораторных условиях, в т.ч. на морских свинках, домашних козах и антилопах. В полевых условиях метод проверен на 11 различных видах диких животных. Подсчитано, что с помощью вертолета с находящимися в нем пилотом, наблюдателем и марки-

ровщиком можно обработать до 1000 животных в день. С помощью этого метода была локализована вспышка антракса в Национальном парке Ваалбос в Южной Африке. Этим же методом пользовались для иммунизации диких животных, отловленных и содержащихся в неволе. Установлено, что вакцинация 55-60% животных в популяции может остановить эпизоотию антракса. Авторы считают этот метод эффективным для борьбы с болезнями диких животных в естественных условиях.

Проблема вакцинации диких животных против антракса также остро стоит и в Танзании (S.Jiwa, 1996). В этой стране в последние годы проводится широкомасштабная вакцинация домашнего скота, которая дает значительный эффект. Однако в национальных парках, которые занимают 25% территории страны (около 1 млн кв. км), необходимо прививать диких животных, т.к. эти территории неблагоприятны по антраксу.

Большое значение имеет защита людей от заражения антраксом в ходе технологических процессов обработки животноводческого сырья (мясо, шерсть, кожа, кости и т.п.). Примеров заражения людей немало в разных странах. М. Hugh-Jones (1996) пишет, что в Великобритании антракс успешно контролируется при использовании импортируемых высушенных на солнце шкур (кожевенного сырья) и костей, однако болезнь все же возникает при использовании сырья из мест, где не проводят исследование сырья для производства мясо-костной муки. В работе P. Turnbull, J. Bowen, J. Gillgan and N. Barret (1996) сообщается о случае заболевания рабочего шерстяной фабрики в Шотландии в 1991 году. В. Crook et al. (1996) обсуждают вопрос об опасности для здоровья человека рабочих мест, загрязненных при переработке текстиля, инфицированного возбудителем антракса. Так, в Швейцарии в 1978-1980 гг. на текстильной фабрике заболели 24 рабочих, занятых переработкой шерсти коз, импортированной из Пакистана (кожная форма и один случай респираторного заражения). Наибольший риск заражения — при сортировке шерсти вручную и на первых стадиях ее обработки (промывка, осветление). Инактивация спор в эксперименте достигалась использованием высоких температур в комбинации с 0,9-процентным раствором формальдегида.

В Италии (С. Brini, F. Piunti, R. Terzi, С. Tonin et al., 1996) также озабочены проблемой дезинфекции шерсти животных (кашемир, мохер, верблюжья шерсть и др.). В 1987-1988 гг. зарегистрированы 2 вспышки у сортировщиков шерсти (один человек умер). Шерсть поступила из Азии. Наибольшему риску, как и в первом примере,

239
подверглись раб
са. Наличие меж
бациллярных и
лотных гарант
Авторы про
на, пара, гамма-
чтобы не импорт
piger. При иссл
СССР, Иран, Ки
зультаты. Эти р
постановки опы
ние больших ко
пока не получен
С. Nwachuk
бойнях в густо
20 коров, предн
инфицированно
несколько ниже
также из проб
мость поддержа
тигигиического
В начале к
лии на острове
нение во внешн
Одновременно
но использовать
расчета 50 л/к
Немаловаж
пов животных,
ни утвердилось
Проведение это
стей, особенно
ния трупов на
Наиболее
ванных ветсан
ную транспорт
ние патогенны
пускаются спе
дованием.
До сих пор
вод предприят

подверглись рабочие на первых стадиях технологического процесса. Наличие международных сертификатов об отсутствии в шерсти бациллярных и споровых форм возбудителя антракса не дает абсолютных гарантий.

Авторы провели ряд исследований с применением окиси этилена, пара, гамма-лучей. Режим дезинфекции должен быть щадящим, чтобы не испортить сырье. Для контроля использовали *Bac. subtilis niger*. При исследовании сырья из различных стран (Австралия, СССР, Иран, Китай, Монголия, Афганистан) получены разные результаты. Эти различия объясняются отчасти разными условиями постановки опыта и качеством необработанного сырья – содержание больших количеств жира и влаги. Окончательный результат пока не получен, требуются дополнительные исследования.

C.Nwachukwu (1998) описывает случаи антракса на 5 скотобойнях в густонаселенном городе Лагосе (Нигерия), где заболели 20 коров, предназначенных для убоя на мясо. Высокие показатели инфицированности обнаружены в пробах навоза и питьевой воды, несколько ниже – в пробах из ротовой полости и сосков вымени, а также из проб крови. Авторы обращают внимание на необходимость поддержания на скотобойнях соответствующего санитарно-гигиенического состояния.

В начале книги уже было дано описание эксперимента в Англии на острове Grunard, которым было доказано длительное сохранение во внешней среде спор вирулентного штамма *Bac. anthracis*. Одновременно было доказано, что для деконтаминации почвы можно использовать формальдегид в виде 5-процентного раствора из расчета 50 л/кв.м. Эффект достигается при двукратной обработке.

Немаловажное значение имеет проблема обеззараживания трупов животных, погибших от сибирской язвы. К настоящему времени утвердилось мнение об обязательном сжигании этих трупов. Проведение этой процедуры наталкивается на целый ряд трудностей, особенно в безлесных зонах. Разрабатываются методы сжигания трупов на месте гибели животных.

Наиболее приемлемо сжигание трупов на специально оборудованных ветсанзаводах. При этом необходимо обеспечить безопасную транспортировку трупов, полностью исключающую рассеивание патогенных микроорганизмов во внешней среде. Для этого выпускаются специальные машины, оснащенные необходимым оборудованием.

До сих пор остро стоит проблема обеззараживания сточных вод предприятий и учреждений, которые работают с патогенными

микроорганизмами (институты инфекционного профиля, биофабрики, лаборатории), а также животноводческие комплексы, инфекционные больницы, изоляторы, утилизационные установки, в сточных водах которых также могут накапливаться возбудители заразных болезней. Есть проблема обеззараживания сточных вод с морских и воздушных судов заграничного плавания.

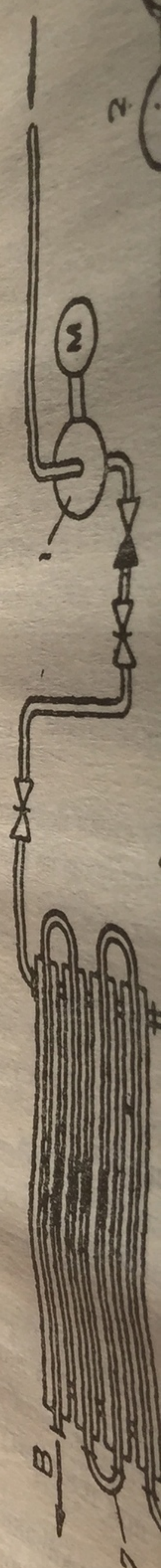
Предложено много различных систем с использованием биологических (биологические фильтры, аэротенки, аэробный биотермический метод, аэробное сбраживание, биологические пруды и др.), химических (активный газообразный хлор, хлорная известь, другие хлорсодержащие вещества, аммиак, озон и др.) и физических (ионизирующие излучения, подводные искровые разряды, электромагнитное поле, ультразвуковые колебания, ультрафиолетовые лучи, термические способы) методов. Каждый из них обладает своими достоинствами и недостатками, различной эффективностью обеззараживания и различной экономичностью.

Однако, с нашей точки зрения, наиболее надежным и эффективным способом является обеззараживание сточных вод с помощью установки пароструйных аппаратов, предложенной ВНИИВВиМ (И.А.Бакулов, В.А.Кокурин, В.М.Котляров, 1971).

Работа установки предусмотрена в двух вариантах (стационарном и передвижном), технология обеззараживания дает 100-процентную гарантию полного уничтожения всей патогенной микрофлоры, независимо от степени ее устойчивости во внешней среде и к различным физическим и химическим факторам. Передвижная установка может быть использована как оперативное средство при ликвидации эпизоотий в животноводческих хозяйствах.

По ГОСТу 26074-84 «Навоз жидкий, ветеринарно-санитарные требования к обработке, хранению, транспортированию и использованию» в пп. 2.3, 2.5, 2.5.3 предусмотрено, что при появлении эпизоотии всю массу навоза обеззараживают до разделения на фракции либо химическими (аммиак, формальдегид), либо термическими (пароструйные установки) способами.

Во ВНИИВВиМ были выполнены исследования по изысканию наиболее эффективного в эксплуатационном отношении способа и устройства для обеззараживания сточных вод термическим методом. На основании результатов, полученных в экспериментальных условиях, создана установка непрерывного действия и разработан способ обеззараживания сточных вод и навозных стоков с использованием струйных аппаратов. Принципиальная схема установки представлена на рис. 26. Установка для обеззараживания стоков



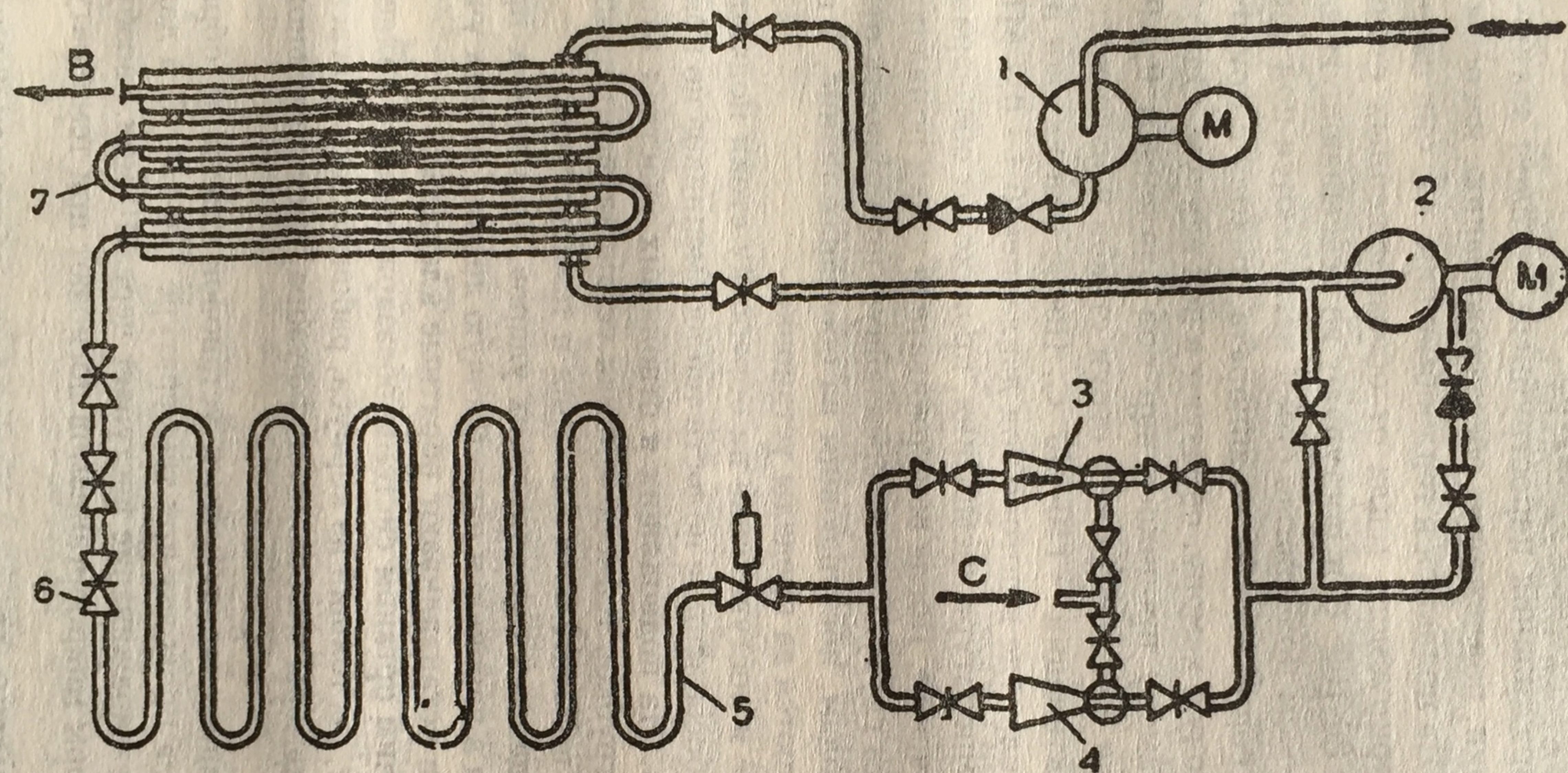


Рис. 26. Принципиальная схема установки обеззараживания сточных вод струйными аппаратами:
 1 - насос-дробилка первой ступени; 2 - насос второй ступени; 3, 4 - струйные аппараты; 5 -
 выдерживатель; 6 - пробоотборник; 7 - теплообменник; А - необеззараженная среда;
 В - обеззараженная среда; С - пар.

состоит из насосной группы, струйных аппаратов и выдерживателя, теплообменника, а также технологических трубопроводов, приборов контроля и пускорегулирующей арматуры.

Принцип обеззараживания пароструйным методом заключается в следующем. Стоки, подлежащие обеззараживанию, насосом под давлением 0,1-0,2 МПа подаются в теплообменник, где они нагреваются за счет рекуперированного тепла от обеззараженных сточных вод до температуры 80-100° С и поступают во всасывающую часть второго насоса. Насосом подогретые стоки нагнетаются под давлением 0,3-0,5 МПа в сопло струйного аппарата, выходя с критической скоростью в рабочую камеру, образуют в ней вакуум. Одновременно в рабочую камеру проникает пар под давлением 0,2-0,45 МПа, конденсируется на поверхности струи стоков и нагревает их до температуры инактивации – 110-130° С. После этого стоки проходят в выдерживатель, где в потоке под давлением 0,1 - 0,2 МПа, соответствующим температуре насыщения, происходит обеззараживание твердых включений. После выдерживателя стоки попадают в теплообменник, через глухую теплопередающую поверхность отдают тепло сточным водам, поступающим на обеззараживание, и охлажденные сбрасываются за пределы установки.

Обеззараженные и поступающие на обработку стоки подаются в соответствующие обособленные полости теплообменников по принципу «противотока». На подводящих и отводящих участках входных и выходных патрубков теплообменника устанавливают приборы для контроля за показателями давления и температуры.

Для предупреждения гидравлических ударов, возможных при попадании жидкости в паровую и нагнетающую линии, на этих участках трубопроводов устанавливают обратные клапаны.

Основным рабочим органом системы обеззараживания является струйный аппарат, состоящий из корпуса, рабочего сопла, всасывающего патрубка, камеры смешения, диффузора, нагнетательного патрубка.

При использовании пароструйных установок тепловую обработку жидкого навоза проводят при температуре 120-130° С и давлении 0,2 МПа. Обеззараживание наступает через 10 мин., возбудители споровых форм микроорганизмов погибают при температуре 120° С.

Установки ВНИИВВиМ для термического обеззараживания сточных вод, как было сказано, предусматриваются в двух основных вариантах (стационарном и передвижном) и на различную производительность – от 1 до 200 м³/ч.

Стационарные установки целесообразно строить в тех местах, где постоянно сосредоточено большое число животных и имеется стационарная котельная (действующим началом установки является пар).

Передвижные установки должны иметь несколько модификаций.

1. Передвижная установка (на прицепе) производительностью 15-20 м³/ч с автономным парообразователем на автомашине. Ее следует использовать в животноводческих хозяйствах, где нет стационарной котельной.

2. Передвижная установка (на прицепе) с использованием пара от стационарной котельной. Ее рекомендуем устанавливать на животноводческих комплексах, где требуется обеззаразить сточные воды от одного или группы корпусов.

3. Передвижная установка на ползьях. Она дешевле, но для ее перемещения на другое место требуются подъемный кран и автотранспорт. Используют ее аналогично предыдущей.

4. Передвижная установка на судне с автономным парообразователем.

Энергетические затраты будут значительно сокращены, если при проведении обеззараживания учитывать степень термоустойчивости микробов. Не вдаваясь в подробности, можно обобщенно рекомендовать следующие режимы:

а) при споровых формах микроорганизмов, в т.ч. возбудителя сибирской язвы, — 120-130°C, экспозиция не менее 10 мин.;

б) при неспоровых формах микроорганизмов — 90-100°C, экспозиция не менее 7 мин.

Метод и установка защищены отечественными авторскими свидетельствами и патентами зарубежных стран (Англия, Франция, США, Канада). Авторы установки удостоены наград Всемирной Организации Интеллектуальной Собственности (1989).

Результаты научных исследований и наблюдений нашли свое отражение в правовых документах, регламентирующих деятельность ветеринарной службы по профилактике и борьбе с сибирской язвой животных и людей у нас в стране и за рубежом.

Несколько раз пересматривалась, изменялась и дополнялась «Инструкция по профилактике и борьбе с сибирской язвой». Наконец она преобразилась и в новом качестве была отражена в Сборнике санитарных и ветеринарных правил «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных» (1996), достоинство которого заключается в том, что данный документ по-

сил уже медико-ветеринарный, т.е. межведомственный характер. Это было значительным шагом вперед к объединению усилий двух служб для решения единой задачи.

Санитарные (СП 3.1.089-96) и ветеринарные (ВП 13.3.1320-96) правила, представленные в Сборнике..., обязательны для выполнения на всей территории Российской Федерации государственными органами, предприятиями и иными хозяйственными субъектами, учреждениями, организациями, общественными объединениями, независимо от их подчинения и форм собственности, должностными лицами и гражданами.

9.1. Мероприятия по профилактике заболеваний животных и людей сибирской язвой

1.1. В стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктах и на угрожаемых территориях территориальный центр госсанэпиднадзора и станция по борьбе с болезнями животных проводят:

- регистрацию эпизоотических очагов в специальном журнале, который постоянно хранится в делах районной (городской) ветеринарной станции и в центре санитарно-эпидемиологического надзора; вместе с журналом обязательно хранят выкопировки с карт территории стационарно неблагополучных пунктов с обозначением на них места и границ почвенных очагов сибирской язвы; указанные места должны быть ограничены канавами (по всему периметру), обнесены изгородью, исключающей случайный доступ людей и животных, и обозначены табличками с надписью «сибирская язва»;

- контролируют проведение работ по ограждению и содержанию в надлежащем санитарном состоянии скотомогильников, отдельных старых захоронений животных и биотермических ям, обеззараживанию почвы в местах с достоверно установленными границами захоронений трупов животных, павших от сибирской язвы;

- организуют постоянный надзор за санитарным состоянием мест скопления скота (базары, выставки, выводки и др.), заготовки, хранения и переработки сырья и продуктов животного происхождения.

1.2. В стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктах и на угрожаемых территориях:

- не допускается вынужденный убой скота без разрешения ветеринарного врача; в случае вынужденного убоя запрещается реализация мяса и других продуктов в пищу людям и для кормления животных без лабораторного исследования;

- требуется обязательное согласование с ветеринарной и санитарно-эпидемиологической службами проведения агро-мелиоратив-

ных, стро
щением г
бирской я
дения из
гих работ
щим зато
вод, а та
выделени
территори
бирской
органы ве
зора с уч
бот;

- регу
ния, вла
ности за

1.3. Н
плановую
болезни
надлежа
в сроки,

1.4. С
акт с ука
нования
ра серии
ной вакц
принадл
по какой
чают в
проведен
известно
нию в у
двух лет

1.5. У
разреша
денных
го скота
ствии по
указани
ных жив
ных про

ных, строительных и других работ, связанных с выемкой и перемещением грунта; в санитарно-защитной зоне почвенных очагов сибирской язвы не разрешается отвод земельных участков для проведения изыскательских, гидромелиоративных, строительных и других работ, связанных с выемкой и перемещением грунта, последующим затоплением, подтоплением или изменением уровня грунтовых вод, а также передача в аренду, продажа в личную собственность, выделение под сады, огороды или иное землепользование участков территории в непосредственной близости к почвенным очагам сибирской язвы; размеры санитарно-защитной зоны устанавливают органы ветеринарной службы и санитарно-эпидемиологического надзора с учетом особенностей местности и вида предполагаемых работ;

- регулярно проводится разъяснительная работа среди населения, владельцев скота и работников животноводства об опасной сущности заболевания сибирской язвой.

1.3. На угрожаемых по сибирской язве территориях проводят плановую профилактическую иммунизацию всех восприимчивых к болезни сельскохозяйственных животных, независимо от их принадлежности, используя принятые в практику вакцины в порядке и в сроки, предусмотренные наставлениями по их применению.

1.4. О проведении прививок против сибирской язвы составляют акт с указанием количества привитых животных (по видам), наименования использованной вакцины, предприятия-изготовителя, номера серии и контроля, даты изготовления и количества израсходованной вакцины. К акту прилагают опись вакцинированных животных, принадлежащих населению, с указанием фамилий владельцев. Если по какой-либо причине животное нельзя вакцинировать, его включают в отдельную опись с указанием причины, из-за которой не проведена вакцинация, и возможного срока прививки, о чем ставят в известность владельца животного. Акты и описи подлежат хранению в учреждениях государственной ветеринарной сети в течение двух лет.

1.5. Убой привитых против сибирской язвы животных на мясо разрешается не ранее чем через 10 суток после прививки. В вынужденных случаях по разрешению ветеринарного врача убой привитого скота может быть проведен ранее указанного срока — при отсутствии поствакцинальных осложнений и соблюдении требований, указанных в действующих «Правилах ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов», а также в «Ветеринарно-санитарных правилах

внутрихозяйственного убоя скота на мясо». Шкуры, снятые с вынужденно убитых животных, хранят в изолированных условиях до получения результатов исследования проб кожи в реакции преципитации.

1.6. Снятие шкур с животных, павших в период до истечения 10 суток после прививки противосибиреязвенной вакцины, не допускается.

1.7. Решение о проведении и объеме профилактической иммунизации людей против сибирской язвы принимается территориальными центрами госсанэпиднадзора при согласовании с местными органами здравоохранения с учетом эпизоотологических и эпидемиологических показаний. Прививкам подлежат лица, по роду деятельности подвергающиеся риску заражения в процессе манипуляций с материалами, подозрительными на обсемененность возбудителем, или при работе с культурами возбудителя сибирской язвы.

1.8. Иммунизация осуществляется в соответствии с инструктивно-методическими документами Госкомсанэпиднадзора РФ и Минздравмедпрома РФ.

1.9. В соответствии с Законом РФ «О ветеринарии» владельцы животных обязаны:

- соблюдать установленные ветеринарные и санитарные правила;
- по требованию ветеринарных специалистов представлять животных для профилактической вакцинации;
- сообщать местным органам государственной ветеринарной службы о вновь приобретенных животных;
- немедленно сообщать ветеринарным специалистам о случаях заболевания, вынужденного убоя или гибели животных.

Руководители и владельцы предприятий по заготовке, переработке и реализации животноводческой продукции и сырья обязаны:

- иметь разрешение органов государственного ветеринарного и санитарно-эпидемиологического надзора на производственную деятельность и выполнять установленные ветеринарные и санитарные правила;
- обеспечивать необходимые условия для проведения ветеринарными специалистами осмотра и ветеринарно-санитарной экспертизы туш и внутренних органов животных, лабораторных исследований, обеззараживания мяса и других продуктов, а также утилизации или уничтожения продуктов, признанных не годными в пищу;
- обеспечивать правильное хранение мясной продукции, а также

СИБИРСКАЯ
сохранность под
проведения лабор
ванных камерах,
- проводить
профессиональн
9.2. Меропр
кой язвой

2.1. При подо
вскрывают. В лаб
стороны, на котор
основания шпагат
занное между пе
ным металлическ
возникло в проц
немедленно прекр
лезенки и пораже
вания берут участ
лимфоузлы. Тру
целиком. До пол
трупы, мясо или
оставляют на мес

2.2. В ветерин
павшего биоматер
кими указаниями
животных и люде
происхождения и
микроскопическо
ческого - до 3-х с

2.3. При полу
ческого исследова
ная лаборатория н
государственному
владельцу животн

2.4. Главный
(города) при пол
обязан:

- немедленно
надзора;

- совместно с п
выехать на место
следование и устан
нирование

сохранность подозрительного на сибирскую язву мяса в период проведения лабораторных исследований в специальных изолированных камерах, холодильниках;

- проводить обучение сотрудников правилам профилактики профессиональных заболеваний сибирской язвой.

9.2. Мероприятия при заболевании животных сибирской язвой

2.1. При подозрении на сибирскую язву трупы животных не вскрывают. В лабораторию направляют ухо павшего животного со стороны, на которой лежит труп, предварительно перевязанное у основания шпагатом или другим материалом в двух местах и отрезанное между перевязками. Место разреза прижигают раскаленным металлическим предметом. Если подозрение на сибирскую язву возникло в процессе вскрытия трупа или разделки туши, работу немедленно прекращают и направляют для исследования часть селезенки и пораженные лимфоузлы. От трупов свиней для исследования берут участки отечной ткани, заглоточные или подчелюстные лимфоузлы. Трупы мелких животных направляют в лабораторию целиком. До получения результатов лабораторного исследования трупы, мясо или туши со всеми внутренними органами и шкурой оставляют на месте падежа (убоя) в условиях строгой изоляции.

2.2. В ветеринарной лаборатории проводят исследование поступившего биоматериала в соответствии с действующими методическими указаниями «Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды». Сроки исследования: микроскопического – в день поступления материала, бактериологического – до 3-х суток, биологического – до 10 суток.

2.3. При получении положительных результатов микроскопического исследования биоматериала на сибирскую язву ветеринарная лаборатория немедленно дает предварительный ответ главному государственному ветеринарному инспектору района (города) и владельцу животного.

2.4. Главный государственный ветеринарный инспектор района (города) при получении предварительного положительного ответа обязан:

- немедленно сообщить территориальному центру госсанэпиднадзора;
- совместно с представителем службы госсанэпиднадзора срочно выехать на место, провести эпизоотолого-эпидемиологическое обследование и установить границы территории, подлежащей карантинированию;

- принять меры к недопущению вывоза подозреваемой в контаминации возбудителем сибирской язвы продукции сельского хозяйства (молока, мяса, кожи и др.).

При получении окончательного заключения на сибирскую язву:

- оформить материалы по установлению карантина и внести их для утверждения в администрацию района (города) с разработанным совместно с центром госсанэпиднадзора планом мероприятий по ликвидации эпизоотического очага;

- немедленно сообщить о заболевании животных сибирской язвой и принятых мерах вышестоящему ветеринарному органу, главным государственным ветеринарным инспекторам соседних районов (городов) для принятия необходимых мер.

2.5. Главный санитарный врач района (города) при получении информации о заболевании животных сибирской язвой обязан совместно с представителем государственной ветеринарной службы организовать эпизоотолого-эпидемиологическое обследование очага и принять участие в разработке плана мероприятий по его ликвидации.

2.6. Ветеринарный орган областной, краевой, республиканской администрации по получении сообщения обязан в установленном порядке доложить об этом руководству управления (министерства) и Департаменту ветеринарии РФ и немедленно командировать на место специалистов ветеринарного отдела (управления), областной (краевой, республиканской) ветеринарной лаборатории для тщательного эпизоотологического обследования и контроля за проведением комплекса профилактических и противоэпизоотических мероприятий.

2.7. Администрация территории по представлению главного государственного ветеринарного инспектора района (города) и главного санитарного врача устанавливает карантин.

2.8. По условиям карантина запрещается:

- ввод и ввоз, вывод и вывоз за пределы карантинированной территории животных всех видов;

- заготовка и вывоз продуктов и сырья животного происхождения, перегруппировка (перевод) животных внутри хозяйства;

- использование молока от больных животных;

- убой животных на мясо;

- вскрытие трупов и снятие шкур с павших животных;

- проведение ветеринарных хирургических операций, кроме неотложных;

- вход на неблагополучную ферму посторонним лицам, въезд на

ее территории
фермы;

- выгон ж
водоемов.

2.9. В э
циалист про
ловья скота,
кой пробой
вания живот

Первая
щих клинич
тела, а такж
аллерген. Э
венной сыво
после клини
язвенную ва

Вторая
очаге. Живо
чение трех л
мотром и из
ми признака
водят в перв

2.10. Для
нию животн
пиднадзора
ют спецдеж
личной гиги
кой язвы ил

Работник
тах тела име
к работе по
и дезинфек
объектов не

2.11. Мо
ода лечения
добавления
хлора, из
молоко от
цинации к
ком очаге
истечения

ее территорию транспорта, не связанного с обслуживанием данной фермы;

- выгон животных на водопой из прудов и других естественных водоемов.

2.9. В эпизоотическом очаге сибирской язвы ветеринарный специалист проводит клинический осмотр и термометрию всего поголовья скота, кроме свиней, которых исследуют кожно-аллергической пробой с сибиреязвенным аллергеном. По результатам исследования животных делят на две группы.

Первая – больные животные. К ней относят животных, имеющих клинические признаки болезни или повышенную температуру тела, а также свиней, положительно реагировавших на введенный аллерген. Этим животных подвергают лечению противосибиреязвенной сывороткой, глобулином и антибиотиками. Через 14 дней после клинического выздоровления им прививают противосибиреязвенную вакцину.

Вторая – остальные животные, находящиеся в эпизоотическом очаге. Животных этой группы вакцинируют с последующим (в течение трех дней) ежедневным (утром и вечером) клиническим осмотром и измерением температуры тела. Животных с клиническими признаками сибирской язвы и повышенной температурой переводят в первую группу.

2.10. Для ухода за больными и подозрительными по заболеванию животными закрепляют по согласованию с центром госсанэпиднадзора отдельный обслуживающий персонал. Его обеспечивают спецодеждой, дезсредствами, аптечками первой помощи, средствами личной гигиены. Эти лица должны быть привитыми против сибирской язвы или подвергнуты экстренной профилактике.

Работников, у которых на руках, лице и других открытых местах тела имеются царапины, ссадины, ранения или повреждения кожи, к работе по уходу за больными животными, уборке трупов, очистке и дезинфекции загрязненных возбудителем помещений и прочих объектов не допускают.

2.11. Молоко от животных первой группы в течение всего периода лечения подлежит обеззараживанию, которое проводят путем добавления хлорной извести, содержащей не менее 25% активного хлора, из расчета 1 кг на 20 литров молока, и 6-часовой выдержки; молоко от животных второй группы в течение трех дней после вакцинации кипятят в течение 4-5 минут и скармливают в эпизоотическом очаге вакцинированным против сибирской язвы животным; по истечении указанного срока молоко под контролем ветеринарных

специалистов вывозят через перевалочный пункт на закрепленный маслозавод для переработки на масло.

2.12. Продукция, выработанная на молочных предприятиях, из молока, поступившего из хозяйства до наложения карантина, реализуется без ограничений.

2.13. Трупы животных, павших от сибирской язвы, а также все продукты убоя, полученные в случаях убоя больных сибирской язвой животных, сжигают; захоронение (зарывание) категорически запрещается.

2.14. Зерно, грубые и сочные корма, заготовленные на благополучных участках посевов, пастбищ, сенокосных угодий, не соприкасавшиеся с больными сибирской язвой животными и не загрязненные их выделениями, допускают к вывозу после снятия карантина.

2.15. Зерно, грубые и сочные корма, полученные с участков, на которых находились больные или павшие от сибирской язвы животные, или контаминированные иным путем, вывозу из хозяйства не подлежат, их скармливают на месте животным, вакцинированным против сибирской язвы.

2.16. Руководители неблагополучных по сибирской язве хозяйств обязаны выделять технику, оборудование, материалы и необходимое количество людей для проведения прививок животным, охранно-карантинных мероприятий, дезинфекционных работ, направленных на уничтожение возбудителя сибирской язвы в объектах внешней среды.

9.3. Мероприятия при заболевании людей сибирской язвой

3.1. Медицинский работник, выявивший больного или подозрительного на заболевание сибирской язвой человека, обязан оказать ему первую помощь и в течение 24 часов направить экстренное извещение в районный центр госсанэпиднадзора.

3.2. О случаях заболевания человека сибирской язвой районный центр госсанэпиднадзора сообщает:

- вышестоящему по подчиненности учреждению госсанэпиднадзора;
- главному государственному ветеринарному инспектору района (города);
- главе администрации по территориальной принадлежности;
- Госкомитету санэпиднадзора Российской Федерации (в виде внеочередного донесения о групповых заболеваниях с числом случаев 5 и более).

251
О случае проф
ме того подается
лении или проф
3.3. Больных
ционные больни
больных можно
где им оказываю
дением Правил
3.4. Laborato
ружение возбуди
ется на базе бакт
ных инфекций об
напиднадзора в
заниями «Лабора
людей, обнаруж
ния и объектах в
3.5. Трупы л
подтвержден лаб
В случае кр
ного больного п
но в присутствии
ным инфекциям)
инфекцией поме
употреблении ха
Захоронение
водится на обыч
предъявляются
фекционных бол
До выноса из
пластиковой пле
сверху для искл
пленку на дно гр
3.6. По мест
водят дезинфек
ваны возбудител
одежда, обувь,
проводят ежедн
посуды, изделий
ным.
3.7. Заклю
госпитализации,

О случае профессионального заболевания сибирской язвой кроме того подается «Извещение об остром профессиональном отравлении или профессиональном заболевании».

3.3. Больных сибирской язвой людей госпитализируют в инфекционные больницы или отделения; там, где такой возможности нет, больных можно изолировать в отдельные терапевтические палаты, где им оказывают квалифицированную лечебную помощь с соблюдением Правил противоэпидемического режима.

3.4. Лабораторная диагностика сибирской язвы у людей и обнаружение возбудителя в вероятных факторах передачи осуществляется на базе бактериологических лабораторий отделов особо опасных инфекций областных, краевых, республиканских центров государственного эпиднадзора в соответствии с действующими методическими указаниями «Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды».

3.5. Трупы людей, умерших от сибирской язвы, когда диагноз подтвержден лабораторно, вскрытию не подвергаются.

В случае крайней необходимости вскрытие трупа сибиреязвенного больного производит только врач-патологоанатом (желательно в присутствии врача-эпидемиолога, специалиста по особо опасным инфекциям) с обязательной последующей заключительной дезинфекцией помещений, всех предметов, инструментария, бывших в употреблении халатов, перчаток, обуви и т.д.

Захоронение трупов людей, умерших от сибирской язвы, производится на обычном кладбище в соответствии с правилами, которые предъявляются при захоронении умерших от особо опасных инфекционных болезней.

До выноса из помещения труп укладывают в гроб, выстланный пластиковой пленкой, такой же пленкой плотно закрывают труп сверху для исключения контакта с кожей лица и рук трупа. Под пленку на дно гроба насыпают слой сухой хлорной извести.

3.6. По месту жительства больного до его госпитализации проводят дезинфекцию предметов, которые могли быть контаминированы возбудителем (сырье и продукты животного происхождения, одежда, обувь, кухонный инвентарь, посуда и др.). В стационаре проводят ежедневную текущую дезинфекцию выделений больного, посуды, изделий медицинского назначения, предметов ухода за больным.

3.7. Заключительную дезинфекцию проводят в помещениях после госпитализации, выписки или смерти больного. Обеззараживанию

подлежат все объекты и помещения, которые могли быть контаминированы возбудителем сибирской язвы.

9.4. Снятие карантина

4.1. Карантин снимает администрация района (города) (на основе совместного представления главного государственного ветеринарного инспектора района или города и руководителя территориального центра госсанэпиднадзора) по истечении 15 дней со дня последнего случая падежа или выздоровления животного, больного сибирской язвой, при отсутствии у животных осложнений после вакцинации.

4.2. Перед снятием карантина главный государственный ветеринарный инспектор района (города) совместно с представителем территориального центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора проверяют полноту выполнения всего комплекса ветеринарно-санитарных и санитарно-противоэпидемических мероприятий в соответствии с требованиями настоящих Правил и вносят по данному вопросу конкретные предложения.

4.3. При снятии карантина составляют акт с указанием динамики случаев заболевания людей и животных, даты и количества павших животных по видам, проведенных ветеринарно-санитарных и санитарно-противоэпидемических мероприятий и т.д. Акт составляют в трех экземплярах, из которых один остается в хозяйстве, а другие направляют в учреждения государственной ветеринарной и санитарно-эпидемиологической служб для оформления материалов на снятие карантина.

9.5. Мероприятия при обнаружении сибирской язвы на мясоперерабатывающих предприятиях

При обнаружении сибирской язвы на предприятие накладывают карантин и проводят следующие мероприятия:

5.1. При обнаружении трупа или больного сибирской язвой животного в загоне предубойного цеха (скотобазы) прием скота прекращают; труп направляют на техническую утилизацию или сжигают; все имеющееся поголовье подвергают клиническому обследованию и термометрии, свиней — аллергическому исследованию с сибиреязвенным аллергеном; животных с повышенной температурой тела и положительно реагирующих на аллерген свиней изолируют и лечат; клинически здоровых животных и свиней из этой партии, не реагирующих на аллерген, немедленно убивают на санитарной бойне.

5.2. Скот из других загонов-накопителей подают на убой в цех первичной переработки.

СИБИРСКАЯ ЯЗВА
5.3. Загон, среди которых, вергают увлажнителей механической

5.4. При о кой язвы пато продукции в ц логический м Пораженную изолируют в м раторном подт ренные орган или сжигают помещений (в других инфи

5.5. Все ра больными сиб должны быть при сибирско ной обработк

5.6. После теля болезни базе животны При отсутств подают на уб

5.7. Каран после заверш контаминиро

9.6. Мер сибирской я дення на пр работе

6.1. При в дення, небла тывающее пр уничтожают, ствии с дейст ного происхо обработке». роприятий

5.3. Загон, прогоны, по которым перемещалась партия животных, среди которых обнаружено заболевание сибирской язвой, подвергают увлажнению дезинфицирующими растворами, тщательной механической очистке от навоза и последующей дезинфекции.

5.4. При обнаружении на конвейере характерных для сибирской язвы патологических изменений убой животных и движение продукции в цехе первичной обработки сырья останавливают, патологический материал направляют на лабораторное исследование. Пораженную тушу и соседние с ней (по две с каждой стороны) изолируют вместе с внутренними органами и шкурами. При лабораторном подтверждении сибирской язвы изолированные туши, внутренние органы и шкуры направляют на техническую утилизацию или сжигают. Прием скота прекращают и проводят дезинфекцию помещений (включая базу и прогоны), оборудования, спецодежды и других инфицированных объектов.

5.5. Все работники предприятия, соприкасавшиеся с животными, больными сибирской язвой, или полученными от них продуктами, должны быть ознакомлены с необходимыми мерами профилактики при сибирской язве и в обязательном порядке подвергнуты санитарной обработке.

5.6. После проведения мероприятий по уничтожению возбудителя болезни проводят термометрию оставшихся на предубойной базе животных (свиней подвергают аллергическому исследованию). При отсутствии подозрительных по заболеванию всех животных подают на убой.

5.7. Карантин с мясоперерабатывающего предприятия снимают после завершения комплекса мероприятий по обеззараживанию контаминированных объектов с контролем качества дезинфекции.

9.6. Мероприятия при выявлении неблагополучного по сибирской язве сырья и продуктов животного происхождения на предприятиях по его заготовке, хранению и обработке

6.1. При выявлении сырья или продуктов животного происхождения, неблагополучных по сибирской язве, на склад или перерабатывающее предприятие накладывают карантин, мясо и субпродукты уничтожают, а в отношении сырья проводят мероприятия в соответствии с действующей «Инструкцией по дезинфекции сырья животного происхождения и предприятий по его заготовке, хранению и обработке». Карантин снимают после проведения указанных мероприятий

Созданы также «Методические указания по лабораторной диагностике сибирской язвы у животных и людей, обнаружению возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды» (1986), утвержденные Главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР и Главным управлением карантинных инфекций Министерства здравоохранения СССР.

С введением на территории России противосибиреязвенных прививок с использованием вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ изменились соответственно и Наставления по ее применению... (1997).

Изменялись и документы международного характера, связанные с проблемой профилактики и борьбы с сибирской язвой. Р.С.В. Turnbull и др. (1998) в своей статье «Деятельность Всемирной Организации Здравоохранения» пишет: «В 1990 году прежний отдел ветеринарного здравоохранения был переименован в «Отдел зоонозных болезней», входящий в состав Отделения по надзору и борьбе с внезапно появляющимися и другими заразными болезнями. Он представляет собой рабочую группу ВОЗ по изучению и борьбе с сибирской язвой, включая и группу международных экспертов по этой проблеме».

Эта группа разработала «Руководство по надзору и борьбе с сибирской язвой человека и животных» (WHO/ZOON/93,170).

В 1990 году была предложена долгосрочная программа, состоящая из трех фаз, под названием «модель программы страны» в качестве первой ступени по совершенствованию надзора и борьбы с сибирской язвой во всем мире. Эту программу предполагается предложить в качестве шаблона, чтобы содействовать другим странам в формулировании их собственных национальных программ по надзору и мерам борьбы с сибирской язвой.

Большое значение в борьбе с инфекционными болезнями животных и людей, в т.ч. с сибирской язвой, имеет создание целого ряда международных сельскохозяйственных и медицинских организаций. Цели и задачи этих организаций разнообразны, но основные — это слежение за мировой эпизоотической и эпидемической ситуацией, организация борьбы с болезнями, в первую очередь с особо опасными, стандартизация препаратов и методов диагностики и лечения, содействие проведению научных исследований по наиболее важным проблемам медицины и ветеринарии и др.

В числе этих организаций можно назвать следующие: Всемирная Ветеринарная Ассоциация (ВВА), Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ), Комиссия по продовольствию и сельскому хо-

зайству (ФАО), Международная ассоциация микробиологических обществ (МАМО), Международное Эпизоотическое Бюро (МЭБ), Организация Африканского Единства, Международное Африканское Бюро животных, Панамериканская организация здравоохранения.

Современная работа по профилактике и борьбе с инфекционными болезнями животных (в особенности с болезнями группы А по классификации МЭБ) немыслима без получения регулярной и полноценной информации. Такую возможность представляет в настоящее время глобальная система компьютеров — «интернет».

Деятельность ветеринарных служб, юридических и физических лиц, работающих в области ветеринарии и регламентируется целым рядом документов глобального и национального уровней. К таким документам относится «Международный ветеринарный кодекс» (1997).

В каждом отдельном государстве также разработаны и приняты свои нормативно-правовые документы по ветеринарии. Так, в России идет напряженная работа по переработке ранее изданного «Ветеринарного законодательства», куда войдут все новые, переработанные документы, регламентирующие деятельность всех, кто в той или иной мере связан с ветеринарией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Абалакин В.А. и др. Влияние летального сибиреязвенного токсина на функциональную активность перитонеальных мононуклеарных фагоцитов и полиморфноядерных нейтрофилов // ЖМЭИ, 1990. - № 2. - с. 62-67.

Абалакин В.А. и др. Влияние протективного антигена *Bac.anthraxis* на формирование иммунитета под действием сибиреязвенных живых вакцин // ЖМЭИ, 1990. - № 5. - с. 72-75.

Абалакин В.А. и др. Постинфекционный и поствакцинальный противосибиреязвенный иммунитет у людей // ЖМЭИ, 1990. - № 6. - с. 71-76.

Абалакин В.А. и др. Оценка антитоксического противосибиреязвенного иммунитета // ЖМЭИ, 1990. - № 12. - с. 78-82.

Авакян А.А., Кац Л.Н., Павлова И.Б. Атлас анатомии бактерий, патогенных для человека и животных // М., 1972. - 70 С.

Агбарян А.Г., Еременко Е.И., Саркисова Н.В. Возможности использования некоторых праймеров в ПЦР для индикации сибиреязвенного микроба // Материалы юбилейной науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. - с.40.

Азизбемян Р.Р., Белых Р.А., Нетыкса и др. Сравнительная характеристика штаммов *Bacillus thuringiensis*, образующих R- и S-формы колоний // Тез. докл. III семинара. - Вильнюс, 1976. - с. 21.

Аксенов М.Ю., Гинцбург А.Л. Диагностика инфекционных заболеваний с помощью метода полимеразной цепной реакции // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол., 1993. - №4. - с. 3-8.

Алимов А.М., Коксин В.П., Галиуллин А.К., Табакова Н.И. Иммунологическая оценка антигенов болезни сибирской язвы / В кн.: 100 лет Курской биофабрике и агробиологической промышленности России: Тез. докл. науч.-произв. конф. (Курск, 27-30 августа 1996 г.) // Курск, 1996. - с. 12.

Ашаханов Г.М., Ургуев К.Р. Сибирская язва животных в республиках Северного Кавказа // Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных. Ставрополь, 1999. - с. 40-42.

Бадашкева А.Г., Кнорре Д.Г. Олиго- и полинуклеотидные зонды. Метод молекулярной гибридизации // Молекулярная биология, 1991. - т. 25, вып. 2. - с. 309-324.

Бакулов И.А. Сибирская язва животных и меры профилактики // Сибирская язва: эпизоотол. и вет.-сан. - с. 10-20.

Бакулов И.А., Селиверстов В.В. Успехи в борьбе с сибирской язвой // Диагностика, профилактика и лечение экзотическими болезнями. практ. конф., посвящ. 100-летию Ветеринарии, 1997. - с. 303-306.

Бакулов И.А., Селиверстов В.В. Материалы по профилактике сибирской язвы. Ветеринария, 1997.

Бакулов И.А., Селиверстов В.В. Сибирская язва: диагностика, профилактика и лечение. практ. конф., посвящ. 100-летию Ветеринарии, 1997. - с.306-308.

Бакулов И.А., Селиверстов В.В. Сибирская язва: диагностика, профилактика и лечение. 1996. - 40 С.

Баран А.А. Полное руководство по диагностике сибирской язвы. Л.: изд-во «Химия».

Безносов М.В. и др. Иммунологические свойства вакцин против сибиреязвенной бациллы. Автореф. дис. канд. вет. наук. - с. 165-168.

Борисович Ю.Ф. Справочник по сибирской язве. - с. 165-168.

Буерова С.В., Хабибуллин Д.А. Получение диагностических...

Бакулов И.А. Сибирская язва сельскохозяйственных и диких животных и меры профилактики в России // Вопросы микробиол., эпизоотол. и вет.-сан. экспертизы: Сб. науч. работ, Ульяновск, 1998. – с. 10-20.

Бакулов И.А., Ведерников В.А., Гаврилов В.А., Числов Ю.В., Селиверстов В.В. Успехи и нерешенные вопросы в профилактике и борьбе с сибирской язвой животных в Российской Федерации / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы междунаро. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. – с. 303-306.

Бакулов И.А., Ведерников В.А., Харкевич А.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В. Дальнейшее совершенствование системы мероприятий по профилактике и борьбе с сибирской язвой животных // Ветеринария, 1997. - № 5. – с. 7-11.

Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Числов Ю.В. Новые формы сибиреязвенной вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ и способ их внутрикожного применения с помощью безыгольного инъектора / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы междунаро. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. – с. 306-308.

Бакулов И.А., Селиверстов В.В., Ведерников В.А., Гаврилов В.А. Сибирская язва: новые данные по эпизоотологии, диагностике и профилактике болезни / Сборник НТД // М.: Информагротех, 1996. – 40 С.

Баран А.А. Полимерсодержащие дисперсные системы // Киев: изд-во «Наукова думка», 1986. – 204 С.

Баран А.А., Тесленко А.Я. Флокулянты в биотехнологии // Л.: изд-во «Химия», 1990. – 144 С.

Безносков М.В. и др. Выделение поверхностного антигена вегетативных клеток *Bacillus anthracis* СТИ-1 и изучение его протективных свойств // ЖМЖ, 1997.- № 1. – с. 9-14.

Белоконов И.И. Электронно-микроскопические исследования сибиреязвенной бациллы в процессе образования и прорастания спор: Автореф. дис... канд. биол. наук // Харьков, 1970. – 18 С.

Борисович Ю.Ф., Кириллов Л.В. Ветеринарные препараты: Справочник / Под ред. Осидзе Д.Ф. // М.: изд-во «Колос», 1981. – с. 165-168.

Буерова С.В., Хаертынов К.С., Галиуллин А.К., Адиятуллина Д.А. Получение диагностических препаратов к антигену возбу-

теля сибирской язвы / В кн.: Научные основы производства вет. биол. препаратов: Тез. докл. Всеросс. науч.-практ. конф., посвящ. 30-летию ВНИИТиБП // Щелково, 2000. – с. 246-247.

Буланцев А.Л., Липницкий А.В. Моделирование возможного сохранения и распространения *Bacillus anthracis* во внешней среде // Материалы юбилейной науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с.356-357.

Бургасов П.Н., Рожков Г.И. Сибиреязвенная инфекция // М.: изд-во «Медицина», 1984. – с. 208.

Васильев Н.Т., Пименов Е.В., Кожухов В.В., Строчко Ю.И., Зубов В.В. Перспективы создания сибиреязвенных вакцин нового поколения // Иммунология, 1999. - № 3. – с. 5-8.

Васильев П.Г., Иванов Ю.И., Садыков Н.С., Кожухов В.В., Зиганшин Р.Ш., Дербина Л.М., Сенькин А.В. Чувствительность штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных из разных источников внешней среды, к видоспецифическим сибиреязвенным бактериофагам. // Материалы юбилейной науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с.64.

Васильев П.Г., Махмуткин В.А., Зиганшин Р.Ш., Кожухов В.В., Васильева Е.П., Галкин А.М., Менухова В.С., Садыков Н.С., Степанов В.И. Структура заболеваемости людей сибирской язвой в Приволжском регионе // Материалы юбилейной науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с.357-358.

Васильев П.Г., Махмуткин В.А., Зиганшин Р.Ш., Садыков Н.С., Степанов В.И., Кожухов В.В., Храповицкий А.Н., Галкин А.М., Менухова В.С., Васильев А.П. Структура заболеваемости сельскохозяйственных животных сибирской язвой по территориям Приволжского региона // Материалы юбилейной науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с.358-360.

Васильев П.Г., Юсупов Р.Х., Махмуткин В.А., Зиганшин Р.Ш., Садыков Н.С., Васильева Е.П., Степанов В.И., Галкин А.М., Менухова В.С., Матюнин Ю.Е. Особенности сезонного распределения эпизоотических проявлений сибиреязвенной инфекции в Приволжском регионе // Материалы юбилейной науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с.360-361.

Вейцер Ю.И., Минц Д.М. Высокомолекулярные флокулянты в процессах очистки природных и сточных вод // М.: «Стройиздат», 1984. – 202 С.

Вишняков И.Ф., Цыбанов С.Ж. Перспективы использования методов анализа генома для диагностики особо опасных болезней животных / В кн.: Состояние, проблемы и перспективы развития

259
СИБИРСКАЯ
вет. науки России
ко, Москва, 16-17
Волкова В.П.
возбудителя сибир.
Микробиология,
Вышелецкий
вакцин на агаре и
рос. съезд вет. вр
Гаврилов В.А.,
щенных образцов
микроба / В кн.:
бо опасными и э
международ. науч
// Покров, 1998.
Гаврилов В.А.,
вание способа выд
возбудителя сибир
/ В кн.: Диагност
ными и экзотическ
род. науч.-практ. к
1998. – с. 311-313.
Гаврилов В.А.,
Концепция примен
// Материалы ме
сибирской язвы. Ал
Гаврилов В.А.
внутрикожного при
ВНИИВВиМ с пом
Курской биофабри
сии: Тез. докл. науч
// Курск, 1996. –
Гаврилов В.А., Л
торское свидетельст
Гаврилов В.А., М
4-й съезд паразитоц
Гаврилов В.А., М
роль бациллоносите
съезд паразитолог
Галиуллин А.К.
ных через разные с
- № 8.

вет. науки России: К 100-летию юбилею ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко, Москва, 16-17 июня 1998 г. // М., 1999. – с. 309-312.

Волкова В.П., Вернер О.М., Синяк К.М. Спорообразование у возбудителя сибирской язвы в модельных почвенных условиях // Микробиология, 1988. – т.50, № 6. – с.31-36.

Вышелесский С.Н. Опыты культивирования сибиреязвенных вакцин на агаре и практического их применения // Тр. 12-й Всерос. съезд вет. врачей. – М., 1910. – вып. 3. – с. 671-680.

Гаврилов В.А., Архипова Г.Ф., Зубаирова П.Ю. Получение очищенных образцов плазмидной ДНК из штаммов сибиреязвенного микроба / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. – с. 310-311.

Гаврилов В.А., Архипова Г.Ф., Зубаирова П.Ю. Совершенствование способа выделения и очистки хромосомной ДНК из клеток возбудителя сибирской язвы и аэробных спорообразующих бацилл / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ / Покров, 1998. – с. 311-313.

Гаврилов В.А., Бакулов И.А., Селиверстов В.В., Числов Ю.В. Концепция применения и производства сибиреязвенных вакцин // Материалы межрегионал. рабочего совещания ВОЗ/ФАО по сибирской язве. Алматы, Казахстан, октябрь 5-6, 1997. – с. 41-43.

Гаврилов В.А., Бакулов И.А., Числов Ю.В. Разработка способа внутрикожного применения сибиреязвенной вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ с помощью безыгольного инъектора / В кн.: 100 лет Курской биофабрике и агробиологической промышленности России: Тез. докл. науч.-произв. конф. (Курск, 27-30 августа 1996 г.) // Курск, 1996. – с. 86-87.

Гаврилов В.А., Лавресюк А.Е., Никитин А.В., Бакулов И.А. Авторское свидетельство № 290100, 1989.

Гаврилов В.А., Матвеева Н.Б. Диагностика сибирской язвы // 4-й съезд паразитологов Украины. Харьков, 1996. – с. 35-36.

Гаврилов В.А., Матвеева Н.Б. Бациллоносительство у свиней, роль бациллоносителей в распространении сибирской язвы // 4-й съезд паразитологов Украины. Харьков, 1995. – с. 36-37.

Галиуллин А.К. Оценка сибиреязвенного иммунитета у животных через разные сроки после вакцинации // Ветеринария, 1994. – № 8. – с. 30-32.

Галиуллин А.К., Коксин В.П., Салмаков К.М., Алимов А.М. Диагностическое значение субъединичного сибиреязвенного антигена // Ветеринария, 1996. - № 1 - с. 17-19.

Галиуллин А.К. и др. Потенциалметрический сенсор для иммунологического анализа возбудителя сибирской язвы // Ветеринария, 1996. - № 11. - с. 17-20.

Гришкевич Н.М., Фаизов Т.Х. Новые подходы обнаружения патогенных бацилл сибирской язвы методами молекулярной биологии / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. - с. 334-335.

Гришкевич Н.М., Фаизов Т.Х. Важные аспекты технологии обнаружения возбудителя сибирской язвы // Материалы юбилейной науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. - с. 79.

Джупина С.И. Сравнительная эпизоотология сибирской язвы // Ветеринария, 1999. - № 9. - с. 13-17.

Егоров В.И., Олескин А.В., Самуилов В.Д. Биотехнология. Проблемы и перспективы // М.: изд-во «Высшая школа», 1987. - с. 53-64.

Еременко В.В., Николаев А.Л. Катаболитная репрессия образования ферментов у микроорганизмов // Проблемы регуляции обмена веществ у микроорганизмов. - Пущино на Оке, 1973.

Еременко Е.И. и др. Эпизоотологическая характеристика сибирской язвы в Чеченской республике // ЖМЖ, 1996. - № 3 (Прилож.). - с. 106-109.

Запольский А.К., Баран А.А. Коагулянты и флокулянты // Л.: изд-во «Химия», 1987. - 204 С.

Зубаиров М.М., Власов Н.А., Киселев А.В., Вишняков И.Ф., Коломыцев А.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В., Бузун А.И., Котляров В.М., Стрижаков А.А., Числов Ю.В., Чупахин О.Н., Чарушин В.Н., Русинов В.Л., Мосин В.М. Патент RU 2111744 С 1 «Препарат Абактан для лечения и профилактики инфекционных болезней животных» от 27.05.1998.

Зубаирова П.Ю. и др. Получение очищенных образцов плазмидной ДНК, выделенных из сибиреязвенных штаммов // Вопросы вет. вирусол., микробиол. и эпизоотологии. Ч. 2. Покров, 1992. - с. 202-203.

Зубаирова П.Ю. и др. Клонирование фрагментов ДНК вакцинного штамма возбудителя сибирской язвы в клетках E.coli // Инст.

261
эксперим. клин.
с. 77.
Зубаирова П.
ДНК вакцинных
клинич. вет. м.
Зубаирова П.
Использование
ции сибиреязвен
вы интеграции
с.-х. произв. При
Махачкала, 199
Ивашкевич
Определение жи
с помощью мик
72-75.
Ипатенко Н.
нария, 1999. - №
Ипатенко Н.
Ветеринария, 20
Ипатенко Н.
мах течения сиб
30.
Ипатенко Н.
Бахтаров С.И.,
// М.: изд-во
Ипатенко Н.
Саленко Л.С., Я
лев Ю.Т., Сайи
сельскохозяйств
№ 5. - с. 27-30.
Ипатенко Н.
вой ассоциирова
штаммов 55-ВНИ
№ 6. - с. 10-11.
Ипатенко Н.
Калунов Ю.А. Д
щих почвенных б
Ипатенко Н.
язва сельскохозяй
1987. - 256 с

эксперим. клинич. вет. мед. Информ. бюлл. 1994. Харьков, 1995. - с. 77.

Зубаирова П.Ю. и др. Рестрикционный анализ хромосомной ДНК вакцинных штаммов сибирской язвы // Инст. эксперим., клинич. вет. мед. Информ. бюлл. 1994. Харьков, 1995. - с. 81.

Зубаирова П.Ю., Цыбанова Л.Я., Гаврилов В.А., Цыбанов С.Ж. Использование метода геномной дактилоскопии для дифференциации сибиреязвенных штаммов // Современ. состояние и перспективы интеграции вет. науки и практики в условиях реформирования с.-х. произв. Прикаспийского региона: Тез. докл. международ. конф., Махачкала, 1997. - с. 70-72.

Ивашкевич П.А., Михайлов Б.Я., Рожков Г.И., Тамарин А.Л. Определение жизнеспособности спор в сибиреязвенной вакцине СТИ с помощью микрокультур // Микробиология, 1959. - № 10. - с. 72-75.

Ипатенко Н.Г. Патогенез сибирской язвы у свиней // Ветеринария, 1999. - № 3. - с. 15-17.

Ипатенко Н.Г. Испытание сибиреязвенных бактериофагов // Ветеринария, 2000. - № 6. - с. 22-23.

Ипатенко Н.Г. Лабораторные исследования при разных формах течения сибирской язвы // Ветеринария, 2000. - № 8. - с. 28-30.

Ипатенко Н.Г., Гаврилов В.А., Зелепукин В.С., Маничев А.А., Бахтаров С.И., Сайиткулов Б.С., Татаринцев Н.Т. Сибирская язва // М.: изд-во «Колос», 1996. - 335 С.

Ипатенко Н.Г., Гаврилов В.А., Маничев А.А., Бахтаров С.И., Саленко Л.С., Яковлева Т.Н., Степанова В.В., Шморгун Б.И., Киселев Ю.Т., Сайиткулов Б. С. Опыт профилактики сибирской язвы сельскохозяйственных животных в России // Ветеринария, 1995. - № 5. - с. 27-30.

Ипатенко Н.Г., Кириллов Л.В., Сторожев Л.И. Испытание живой ассоциированной вакцины против сибирской язвы и эмкара из штаммов 55-ВНИИВВиМ и 2/14 ВГНКИ // Ветеринария, 1999. - № 6. - с. 10-11.

Ипатенко Н.Г., Маничев А.А., Шморгун Б.И., Тихонов В.Л., Калунов Ю.А. Дифференциация *Bac.anthraxis* от спорообразующих почвенных бацилл // Ветеринария, 1995. - № 7. - с. 19-22.

Ипатенко Н.Г., Седов В.А., Зелепукин В.С. и др. Сибирская язва сельскохозяйственных животных // М.: «Агропромиздат», 1987. - 256 С.

Ипатенко Н.Г., Федоров Ю.В., Филиппов Н.В. Особенности развития сибиреязвенного процесса // Ветеринария, 2000. - № 2. - с. 22-25.

Ипатенко Н.Г., Шморгун Б.И., Саленко Л.С. Компоненты для реакции преципитации при сибирской язве // Ветеринария, 1999. - № 10. - с. 15-17.

Ипатенко Н.Г., Яковлева Т.Н. Свойства нетипичных форм *Vac.anthraxis* // Ветеринария, 1996. - № 5. - с. 21-26.

Ипатенко Н.Г., Яковлева Т.Н., Бахтаров С.И. Лечение животных, больных сибирской язвой // Ветеринария, 1999. - № 4. - с. 18-23.

Кабанов В.Н., Топчиев Д.К. Полимеризация ионизирующихся мономеров // М.: изд-во «Наука», 1975. - 224 С.

Кадымов Р.А., Сафаров Ю.Б. Ассоциированная и комплексная вакцинации животных // М.: изд-во «Колос», 1974. - 271 С.

Калинин Н.Л. Лектины в микробиологических диагностикумах: универсальное средство или всего лишь проба на гликозилированность // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол., 1995. - № 1. - с. 3-8.

Калинин Н.Л., Шаханина К.Л., Кулякина М.Н. Количественный анализ *Vac.anthraxis* с использованием конъюгата агглютинина сои // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол., 1993. - № 6. - с. 27-29.

Карпов В.С., Чернявский В.Ф., Каратаева Т.Д. Основные зооантропонозы в Якутии (эпизоотология и эпидемиология) // Якутск, 1997. - с. 27-66.

Кац Л.Н. Цитологическое и цитохимическое исследование капсулы и оболочки клетки *Vac.anthraxis* // Микробиология, 1964. - т.33, вып. 5. - с. 836-843.

Киреев Ю.Г., Прометной В.И. О введении дополнительных характеристик очагов сибирской язвы в журнал стационарно-неблагополучных пунктов // Материалы юбилейной науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. - с.372-374.

Кисленко В.Н., Шкиль Н.А., Димов С.К., Колосов А.А., Юрик С.А. Основы географической эпизоотологии. Учебное пособие // Новосибирск, 1997. - 84 С.

Колбасов Д.В., Цыбанов С.Ж. Геномный полиморфизм возбудителя сибирской язвы / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. - с. 316-318.

263
Колбасов Д.
ния патогенны
Диагностика
зотическими б
практ. конф.,
с. 321-323.
Колбасов Д.
Цыбанов С.Ж.
полимеразной
ства вет. биол.
посвящ. 30-лет
Колосов С.
228 С.
Комиссаров
Лещенко А.А.,
шин Р.Ш. Вли
вых свойств гл
кого // Матер
НИИ микробио
Комиссаров
Лещенко А.А.,
ния полуфабри
го жидкого для
учн. конф., посв
1998. - с. 303-30
Комиссаров
Лещенко А.А.,
рофилтрационн
пературных реж
тивосибирезвен
ной научн. конф.
Киров, 1998. - с.
Комоско Г.В.,
Жучихин Ю.С.,
тельной среды на
глубинного куль
штамма СТИ-1 /
70-летию НИИ
Коротич А.С.,
во «Урожай», 197

Колбасов Д.В., Цыбанов С.Ж. Современные подходы типирования патогенных микоплазм и возбудителя сибирской язвы / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы междунаро. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. – с. 321-323.

Колбасов Д.В., Цыбанова Л.Я., Конвисарев А.П., Селянинов Ю.О., Цыбанов С.Ж. Выявление ДНК сибиреязвенных штаммов методом полимеразной цепной реакции / В кн.: Научные основы производства вет. биол. препаратов: Тез. докл. Всеросс. науч.-практ. конф., посвящ. 30-летию ВНИИТиБП // Щелково, 2000. – с. 244-246.

Колесов С.Г. Сибирская язва // М.: изд-во «Колос», 1976. – 228 С.

Комиссаров А.В., Белова Е.В., Жучихин Ю.С., Нестеров Ю.Е., Лещенко А.А., Логвинов С.В., Васильев П.Г., Комоско Г.В., Зиганшин Р.Ш. Влияние переменных температур на сохранение целевых свойств глобулина противосибиреязвенного лошадиного жидкого // Материалы юбилейной научн. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с. 302-303.

Комиссаров А.В., Белова Е.В., Жучихин Ю.С., Нестеров Ю.Е., Лещенко А.А., Швецов С.А. Разработка режима и среды высушивания полуфабриката глобулина противосибиреязвенного лошадиного жидкого для медицинских целей // Материалы юбилейной научн. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с. 303-304.

Комиссаров А.В., Белова Е.В., Жучихин Ю.С., Нестеров Ю.Е., Лещенко А.А., Шведов В.В. Оценка качества основных типов микрофльтрационных мембран и экспериментальное обоснование температурных режимов стерилизующей фильтрации глобулина противосибиреязвенного лошадиного жидкого // Материалы юбилейной научн. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с. 304.

Комоско Г.В., Комиссаров А.В., Белова Е.В., Рогозинский В.Г., Жучихин Ю.С., Филимонова Г.В., Ковтун А.Л. Разработка питательной среды на основе панкреатического гидролизата казеина для глубинного культивирования клеток сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1 // Материалы юбилейной научн. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с. 305.

Коротич А.С., Погребняк П.И. Сибирская язва // Киев: изд-во «Урожай», 1976. – 159 С.

Котляров В.М., Бударкова Э.Л., Николайчук Л.Ф., Пундир П.С. Диагностическая значимость серологических реакций при сибирской язве / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. – с. 325-327.

Кутаев Д.А., Пятков В.А., Елагин Г.Д., Васильев П.Г. Разработка эритроцитарного диагностикума для обнаружения и идентификации возбудителя сибирской язвы // Материалы юбилейной науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с.134-135.

Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды (методические указания) // М.: «Агропромиздат», 1989. – с. 1-31.

Лайшев А.Х., Лайшев К.А., Колпащиков Л.А. Эпизоотическая обстановка в популяции диких северных оленей на Таймыре // Ветеринария, 1995. - № 9. – с. 11-16.

Маничев А.А., Шморгун Б.И. Усовершенствованный способ изготовления преципитирующей сибиреязвенной сыворотки // Ветеринария, 1995. - № 1. – с. 30-34.

Материалы межрегионального рабочего совещания ВОЗ/ФАО по сибирской язве (под ред. Б.Л.Черкасского) // Алматы, Казахстан, октябрь 5-6, 1997. – 82 С.

Мельник Н.В. Усовершенствование промышленной технологии производства противобруцеллезной вакцины с использованием современных приборов и аппаратов: Автореф. дис... канд. биол. наук. – М., 1992. – 22 С.

Методические рекомендации по дифференциации *Bac. anthracis* от близкородственных бацилл, основанные на их различиях в питательных потребностях // Иркутск, 1985.

Микшис Н.И., Еремин С.А., Болотникова М.Ф. Корреляция вирулентности *Bacillus anthracis* с экспрессией признаков, кодируемых хромосомными генами // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол., 1999. - № 4. – с. 25-29.

Митин С.С., Селиверстов В.В. Изучение влияния глицерина на иммуногенность противосибиреязвенной вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ / В кн.: 100 лет Курской биофабрике и агробиологической промышленности России: Тез. докл. науч.-произв. конф. (Курск, 27-30 августа 1996 г.) // Курск, 1996. – с. 212-214.

Михайлов Б.Я., Рожков Г.И., Тамарин А.Л. Экспрессный метод диагностики и инфекции возбудителя сибирской язвы // Микробиол., 1960. - № 11. - с.10-15.

Михин Н.А., Леонов Н.И. Курс ветеринарной микробиологии // М.: «Сельхозгиз», 1938. - с. 212-258.

Михин Н.А. Сибирская язва человека и сельскохозяйственных животных // М.: «Медгиз», 1942. - 98 С.

Мостов Э.Г., Тарунов В.С., Дербин М.Н. и др. // Микробиология, 1982. - № 1. - с.86.

Найманов П.И., Голубинский Е.П., Соркин Ю.И. О питательных потребностях штаммов бациллы антракис и особенностях роста шт. СТИ-1 в условиях периодического культивирования на жидких синтетических средах // ЖМЭИ, 1984. - № 6. - с. 55-59.

Найманов П.И., Голубинский Е.П., Соркин Ю.И. и др. Потребление in vitro аминокислот клетками *Bac.anthraxis* // ЖМЭИ, 1986. - № 4. - с. 30-34.

Николайчук Л.Ф., Вишняков И.Ф., Бакулов И.А., Котляров В.М., Бударкова Э.Л. Индикация спор возбудителя сибирской язвы в объектах внешней среды и кормах иммуноферментным методом / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. - с. 327-329.

Николайчук Л.Ф., Вишняков И.Ф., Гаврилов В.А., Бакулов И.А., Котляров В.М. Идентификация возбудителя сибирской язвы иммуноферментным методом / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. - с. 329-330.

Никулин А.Н., Бакулов И.А., Балышев В.М., Селянинов Ю.О., Глухарева Е.Н., Жестерев В.И., Бадаев Ф.А. Оценка иммуногенности и безвредности экспериментальной ассоциированной вакцины против сибирской язвы и оспы овец / В кн.: Научные основы производства вет. биол. препаратов: Тез. докладов Всеросс. науч.-практ. конф., посвящ. 30-летию ВНИИТиБП // Щелково, 2000. - с. 170-172.

Никулин А.Н., Бакулов И.А., Косяченко Н.С., Щетникова Л.А., Горшкова Т.Ф. Изучение биологических свойств вакцинных штаммов *Bac.anthraxis* и вируса оспы овец в процессе хранения экспериментальной ассоциированной вакцины / В кн.: Научные основы производства вет. биол. препаратов: Тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 30-летию ВНИИТиБП // Щелково, 2000. - с.168-170.

Носков А.Н., Кравченко Т.Б., Носков В.П. Выявление функционально-активных доменов в молекуле протективного антигена сибиреязвенного токсина // Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол., 1996. - № 3. - с. 16-20.

Носков А.Н., Кравченко Т.Б., Носков В.П. Выявление функционально-активных доменов в молекуле летального фактора сибиреязвенного экзотоксина // Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол., 1996. - № 3. - с. 20-22.

Перзашкевич В.С., Цыбанов С.Ж., Кадетов В.В., Селянинов Ю.О., Цыбанова Л.Я., Числов Ю.В., Егоров В.В. Определение возбудителя сибирской язвы в реакции латекс-агглютинации / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. - с. 332-334.

Перт С.Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток // М.: изд-во «Мир», 1978. - 332 С.

Пименов Е.В., Жучихин Ю.С., Комоско Г.В., Шведов В.В., Воронин Е.С., Девришев Д.А., Котляров В.М., Хухоров И.Ю. Универсальная вакцина против сибирской язвы людей и животных / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. - с. 308-310.

Попов С.В., Липницкий А.В. Особенности взаимодействия *Bacillus anthracis* с фагоцитами хозяина в зависимости от плазмидного спектра возбудителя // ЖМЭИ, 1996. - № 2. - с. 13-17.

Раскин Б.М. Экспериментальные обоснования применения гидролизатов крови животных в качестве питательных основ бактериологических сред / В кн.: Научные основы технологии промышл. произ-ва вет. биолог. препаратов // Тез. докл. 2-й Всесоюзн. конф. - М., 1981. - с. 121-122.

Робинау К.Ф. Хроматиновые тельца бактерий / В кн.: Анатомия бактерий // М., 1960. - с. 202-236.

Романов Г.И., Маничев А.А., Лукьянченко А.В. Вакцина СТИ живая против сибирской язвы животных // ГОСТ. - Госкомстандарт, 1986. - 21 С.

Салтыков Р.А., Бакулов И.А., Гаврилов В.А. Характеристика сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1, хранившегося 30 лет в виде лиофилизированных спор // ЖМЭИ, 1976. - № 6. - с. 62-65.

267
Саяпин
Дармов И.
ров Н.В.,
цифичес
полимераз
конф., пос
- с. 213-21
Седел
Юдников
ния сухих
тельной су
Материал
робиологи
Седов
ятий проти
условиях
Селивер
сибиреязв
Федерации
по сибирск
Селивер
Маничев А.
/ В кн.: 1
мышленнос
августа 199
Селянин
Числов Ю.
ческих анти
/ В кн.: Ди
ными и экз
род. науч.-т
кров, 1998.
Синяк К
будителя си
значениях р
биолог., 198
Сколубов
ской области
язвой) // Ж
Смирнов
мия», 1987

Саяпина Л.В., Анисимова Т.И., Тучков И.В., Куличенко А.Н., Дармов И.В., Воробьев А.А., Сергеева Г.М., Гагарина С.Б., Майоров Н.В., Костюкова Т.А., Еремин С.А. Изучение активности и специфичности тест-системы для выявления ДНК *B.anthraxis* методом полимеразной цепной реакции // Материалы юбилейной научн. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с.213-214.

Седельников И.Н., Дремин Е.А., Рогожин А.З., Бирюков В.В., Юдников В.А., Желудкова Е.В. Оценка возможности использования сухих основ питательных сред, полученных методом распылительной сушки, для культивирования сибиреязвенного микроба // Материалы юбилейной научн. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ, Киров, 1998. – с.334-335.

Седов В.А., Кругликов Б.А. Особенности проведения мероприятий против бешенства, сибирской язвы и ящура в экстремальных условиях // Ветеринария, 1994. - № 8. – с. 9-11.

Селиверстов В.В. Оценка эффективности применения противосибиреязвенной вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ в Российской Федерации // Материалы межрегионал. раб. совещ. ВОЗ/ФАО по сибирской язве. Алматы, Казахстан, 1997. – с. 43-44.

Селиверстов В.В., Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Митин С.С., Маничев А.А., Куколев С.А. Вакцинопрофилактика сибирской язвы / В кн.: 100 лет Курской биофабрике и агробиологической промышленности России: Тез. докл. науч.-произв. конф. (Курск, 27-30 августа 1996 г.) // Курск, 1996. – с. 261-265.

Селянинов Ю.О., Цыбанов С.Ж., Кадетов В.В., Сенечкина Е.К., Числов Ю.В., Николайчук Л.Ф. Выделение растворимых специфических антигенов *B.anthraxis* и изучение их иммуногенных свойств / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. – с. 323-325.

Синяк К.М., Вернер О.М. Вегетация и спорообразование у возбудителя сибирской язвы (вакцинный штамм СТИ) при различных значениях рН среды культивирования // Изв. АН СССР, сер. биол., 1983. - № 5. – с. 686-692.

Сколубович Г.В., Рубан Г.Е. Вспышка сибирской язвы в Амурской области в 1954 г. (Из опыта диагностики и борьбы с сибирской язвой) // ЖМЖ, 1995. - № 4. – с. 102-105.

Смирнов Н.Н. Биохимические реакторы // Л.: изд-во «Химия», 1987. – с. 37-41.

Собакин А.С. Испытание экспериментальных образцов ассоциированной вакцины против сибирской язвы и ящура // Ветеринария, 1993. - № 12. - с. 20-23.

Солохин Е.В., Федорцов К.К. Клеточные механизмы противосибиреязвенного иммунитета // ЖМЖ, 1995. - № 5. - с. 72-77.

Статистический справочник "Инфекционные болезни человека в СССР" (под ред. проф. П.Н.Бургасова) // М.: изд-во «Медицина», 1968.

Степанов А.С. О молекулярной природе токсина *Bacillus anthracis* // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол., 1991. - № 1. - с. 3-9.

Тедиков В.М., Добрица А.П. Клонирование и экспрессия детерминанты протективного антигена *Bacillus anthracis* в клетках *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus anthracis* // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол., 1993. - № 2. - с. 13-16.

Тимошин В.Б., Замараев В.С., Антонов В.А., Липницкий А.В. Видоспецифический ДНК-зонд для идентификации токсигенных штаммов возбудителя сибирской язвы // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол., 1994. - № 1. - с. 30-33.

Тимошин В.Б., Замараев В.С., Липницкий А.В. Конструирование рекомбинантного фага - fZAT6 - продуцента одноцепочечного ДНК-зонда для идентификации штаммов *Bacillus anthracis*, несущих плазмиду pX01 // Биотехнология, 1995. - № 5. - с. 6-11.

Тржецкая Т.А., Куликовский А.В. Тонкое строение вирулентного шт. *Bac. anthracis* // ВНИИ вет. санитарии, 1972. - т. 42. - с. 144-151.

Тучков И.В., Куличенко А.И., Норкина О.В., Еремин С.А., Куличенко М.А., Дроздов И.К. Разработка способа детекции спор сибиреязвенного микроба с использованием полимеразной цепной реакции // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций: Материалы Рос. науч. конф., Волгоград, 21-22 окт., 1992. - с. 171.

Угрюмов Г.А. и др. Случай вспышки сибирской язвы в Бурятии // Ветеринария, 1995. - № 9. - с. 10-11.

Ургуев К.Р., Ашаханов Х.М. Эпизоотология и меры борьбы с особо опасными болезнями животных // Ветеринария, 2000. - № 1. - с. 8-11.

Ургуев К.П., Бакулов И.А., Нажалов М.А. и др. Разработка ассоциированной вакцины против сибирской язвы и клостридиоза овец // Доклады РАСХН, 1999. - № 4. - с. 40-43.

Ургуев К.П., Нажалов М.А., Джамбулатов З.М. Эпизоотологическая обстановка по сибирской язве животных в Дагестане // Ветеринария, 1999. - № 2. - с. 22-25.

269
Фаизов Т.
ринария, 1995
Федотов В.
дровых почв
ской язве. М.
Фоменко А.
ростовых свой
массы микроо
промышл. про
юзн. конф. - М
Цыбанов С.
мов сибирской
ал. проблемы в
тика, биотехно
НИСХИ // п
Цыбанов С.
бирской язвы с
Научные основ
тов: Тез. докл.
с. 138-139.
Цыбанов С.
язвы с помощью
проблемы биотех
ринарии: Матер
Цыбанов С.
теля сибирской
ней в животнов
М., 1999. - с. 63
Цыбанова Л.
цинных штаммов
менное состояние
условиях соврем.
международной к
А.П., Цыдыпов В.
ской язвы с пом
меры борьбы с ос
ных: Материалы
тию ВНИИВВМ
Цыбанова Л.Я
В.Ц. Раз

Фаизов Т.Х. и др. Геноидентификация *Bac.anthraxis* // Ветеринария, 1995. - № 5. - с. 30-31.

Федотов В.С. Выживаемость возбудителя сибирской язвы в тундровых почвах // Тез. плен. засед. Междвед. комиссии по сибирской язве. М., 1978. - с. 148-150.

Фоменко А.С., Власова Н.П., Коротеева Л.А. и др. Изучение ростовых свойств питательных сред на основе ферментолита биомассы микроорганизмов // В кн.: Научные основы технологии промышл. произ-ва вет. биол. препаратов / Тез. докл. 2-й Всесоюзн. конф. - М., 1981. - с. 126-127.

Цыбанов С.Ж. и др. Изучение геномного полиморфизма штаммов сибирской язвы и спорообразующих сапрофитов / В кн.: Актуал. проблемы вирусологии (молекул. биология, иммунол., диагностика, биотехнол., эпизоотол. и эпидемиология: Тез. докл. науч. конф. НИСХИ // пгт. Гвардейский, 1994. - Ч. 2. - с. 121.

Цыбанов С.Ж. и др. Анализ генома штаммов возбудителя сибирской язвы с помощью полимеразной цепной реакции / В кн. Научные основы технологии промышл. произв. вет. биопрепаратов: Тез. докл. 5 Всерос. конф. ВНИИТиБП // Щелково, 1996. - с. 138-139.

Цыбанов С.Ж. и др. Идентификация возбудителя сибирской язвы с помощью полимеразной цепной реакции / В кн.: Актуал. проблемы биотехнологии в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: Материалы науч. конф. РАСХН // М., 1996. - с. 87.

Цыбанов С.Ж. и др. Выявление атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы // В кн.: Проблемы инфекц. и инваз. болезней в животноводстве на современном этапе: Тез. докл. МВА // М., 1999. - с. 63-65.

Цыбанова Л.Я. и др. Генотипирование хромосомной ДНК вакцинных штаммов сибирской язвы с помощью ПЦР / В кн.: Современное состояние и перспективы интегр. вет. науки и практики в условиях соврем. с.-х. произв. Прикаспийского региона: Тез. докл. международной конф. // Махачкала, 1997. - с. 32-33.

Цыбанова Л.Я., Селянинов Ю.О., Колбасов А.В., Конвисарев А.П., Цыдыпов В.Ц. Дифференциация вакцинных штаммов сибирской язвы с помощью ПЦР / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. - с. 313-314.

Цыбанова Л.Я., Селянинов Ю.О., Конвисарев А.П., Цыдыпов В.Ц. Разработка набора препаратов для выявления ДНК возбу-

теля сибирской язвы методом ПЦР / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. – с. 315-316.

Числов Ю.В. Концентрирование суспензий бактериальных спор вакцинного сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ // Ветеринария, 1998. – № 10. – с. 19-21.

Числов Ю.В., Косяченко Н.С., Никулин А.Н. Определение чувствительности сибиреязвенных вакцинных штаммов к антибиотикам / В кн.: Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: Материалы международ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ // Покров, 1998. – с. 331-332.

Числов Ю.В., Котляров В.М., Бакулов И.А. Модификация сульфитного метода и его использование для определения коэффициента массопередачи по кислороду в ферментерах // Вопросы вет. вирусол., микробиол. и эпизоотол.: Тез. докл. научн. конф. ВНИИВВиМ. – Покров, 1983. – с. 178-180.

Чуйская Г.Я. Почва как среда сохранения и размножения возбудителя сибирской язвы // Актуал. вопр. проф. сиб. язвы в СССР. – М., 1971. – с. 72-73.

Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. Геномный полиморфизм возбудителей бактериальных инфекций // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол., 1991. – № 2. – с. 3

Amaraoni A., Tabarra K.F., Zaghloul K. Anthrax of the eyelids // Brit. J. Ophthalmol., 1992. – vol. 76, N 12. – p. 753-754.

Bbalo G Anthrax in Western Province, Zambia // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 11. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986. – v. 2.

Bhat P., Mohan D.N., Lalitha M.K. Current incidence of anthrax in animals and man in India // Salisbury Med. Bul. – 1990 – N68. – P. 8. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

Bhat P., Mohan N. Human anthrax as seen in southern India // Salisbury Med. Bul. – 1990 – N68. – P. 12. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

Bowen J., Manchee R. J., Watson S., Turnbull P.C.B. Inactivation of Bacillus anthracis vegetative cells and spores by gamma irradiation // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 70. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

271
Brewer C.
of nutritional
Bacillus ant
Brewer
nutritional
- v. 10. -
Brini C.
Tommaso S.
connected p
1996 - N87
England, Se
Carpov
v. 22, N 5/
Cherkas
- N87. - P.
Sept. 19-21,
Cooper J.
of anthrax
Bul. - 1996
England, Se
Davies I.
formation a
1960. - v. 5
De Vos
South Afric
23. Proc. In
1989.
De Vos
temporal an
Med. Bul. -
Winchester,
Dogana
- 1996 - N8
England, Se
Dogana
Bul. - 1990 -
England, Ap
Dragon I
northern Ca
Proc. Int. W
1995

Brewer C.R., Mc. Cukkough W.G., Mills R.C. et al. Application of nutritional studies for development of practical culture media for *Bacillus anthracis* // Arch. Biochem., 1946. – v. 10. – p. 77-80.

Brewer C.R., Mc.Cullough W.G., Mills R.C. Studies on the nutritional requirements of *Bacillus anthracis* // Arch.Biochem., 1946. – v. 10. – p. 65-75.

Brini C., Piunti F., Terzi R., Tonin C., Innocenti R., Moiraghi A., Di Tommaso S. Disinfection and decontamination of animal fibres: connected problems and state of the art // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 78. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Carpov A., Luca C., Drugan S. // Macromol. Sci. Chem., 1985. – v. 22, N 5/7. – p. 907-929.

Cherkasskiy B. Anthrax in Russia // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 6. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Cooper J.E., Matovelo J.A., Baskerville A. Pathology and diagnosis of anthrax in African wild dogs (*Lycaon pictus*) // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 83. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Davies D.G The influence of temperature and humidity on spore formation and germination in *Bacillus anthracis* // J. Hyg. Camb., 1960. – v. 58. – p. 177-186.

De Vos V. The ecology of anthrax in the Kruger National Park, South Africa // Salisbury Med. Bull. Suppl., 1990. – N68. – P. 19-23. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

De Vos V., Bryden H.B. Anthrax in the Kruger National Park: temporal and spatial patterns of disease occurrence // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 26. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Doganay M. Human anthrax in Turkey // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 8. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Doganay M. Human anthrax in Sivas, Turkey // Salisbury Med. Bul. – 1990 – N68. – P. 13. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

Dragon D.C., Rennie R.P., Gates C.C. Bison and anthrax in the northern Canada // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 22. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Dragon D.C., Rennie R.P. The ecology of anthrax spores: tough but not invincible // *Can. Vet. J.*, 1995. – v. 36, N 5. – p. 295-301.

Fernelius A.L. Comparison of two heat-shock methods and a phenol treatment method for determining germination rates of spores of *Bacillus anthracis* // *J. Bacteriol.*, 1960. – p. 755-756.

Foster J.W., Perry J.J. Intracellular events occurring during endotropic sporulation in *Bacillus mycoides* // *J. Bacteriol.*, 1954. – v. 67. – p. 296-308.

Franz G. // *Adv. Polym. Sci.*, 1986. – v. 76. – p. 3-36.

Freese F., Oh G.K., Freese E.B., Diesterhalf M.D., Prasad C. Suppression of sporulation of *Bacillus subtilis* // In: *Spores Pap. 5th Int. Spore Conf. Fontana (Wisc.)*, 1971 // Washington, 1972. – p. 212-221.

Gerhardt P. Cytology of *Bacillus anthracis* // *Federation Proceed.*, 1967. – v. 26, N 5. – p. 1504-1517.

Gessler F., Rendel J., Bohnel H. Possible oral vaccination of wildlife against anthrax using *B. anthracis* strain Sterne 34F2 spores // *Salisbury Med. Bul.* – 1996 – N87. – P. 112. *Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.*

Gladstone G.P. Inter-relationships between amino-acid in the nutrition of *Bacillus anthracis* // *Brit. J. Exp. Path.*, 1939. – v. 20, N 2. – p. 189-200.

Gladstone G.P., Fildes P. // *Brit. J. Exp. Path.*, 1940. – v. 21. – p. 161.

Green B.D. et al. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis* // *Infect. Immun.*, 1985. – v. 49, N 2.

Gregory I. // *J. Colloid Interf. Sci.*, 1975. – v. 42.

Grelet N. Le déterminisme de la sporulation de *Bacillus megaterium* // *IY Constituants minéraux du milieu synthétique nécessaires à la sporulation* // *Ann. Inst. Pasteur*, 1952. – v. 83. – p. 71-79.

Grelet N. Growth limitation and sporulation // *J. Appl. Bacteriol.*, 1957. – v. 20. – p. 315-324.

Halvorson H.O. Symposium on initiation of bacterial growth. IY Dormancy germination and outgrowth // *Bact. Rev.*, 1959. – v. 23. – p. 267-272.

Hanson R.S., Srinivasan V.R., Halvorson H.O. Biochemistry of sporulation. I. Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells // *J. Bacteriol.*, 1963. – v. 85. – p. 451.

Hardjoutomo S. Incidence of anthrax in Indonesia 1986-1995 // *Salisbury Med. Bul.* – 1996 – N87. – P. 9. *Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.*

Hardjoutomo S. Anthrax in Indonesia: a continuing problem for a developing country // Salisbury Med. Bul. – 1990 – N68. – P. 14. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

Hattori R. Growth and spore formation of *Bacillus subtilis* adsorbed on an anionexchange resin // J. Gen. Appl. Microbiol., 1976. – v. 22, N 4. – p. 216-226.

Hoch J.A., Mathews J.L. Chromosomal location of pleiotropic negative sporulation mutation in *Bacillus subtilis* // J. Genetics, 1973. – v. 73, N 2. – p. 215.

Hugh-Jones M.E. Quality of reports – OIE World Animal Health in 1993 and the 1993 FAO-OIE-WHO Animal Health Yearbook // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 3. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Hugh-Jones M.E. World situation 1993/94 // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 1. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Ivins B.E., Welkos S.L., Little S.F. et al. Immunization against anthrax with *Bacillus anthracis* protective antigen combined with adjuvants // Infect. Immunity, 1992. – v. 60, N 2. – p. 662.

Jaeger H.G., Lindeque P.M. Anthrax in Namibia: a review of outbreaks in livestock and game between 1984 and 1989 // Salisbury Med. Bul. – 1990 – N68. – P. 15. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

Jiwa S.F.H. Experience with anthrax control in areas of Tanzania // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 10. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Jones M.N., Turnbull P.C.B. Disinfection against spores of *Bacillus anthracis* // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 74. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Joshi D.D., Pradhan A., Ghimire N.P. Evidence of anthrax in humans and animals in Nepal // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87 – P. 12. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Keim P., Kalif A., Schupp J., Hill K., Travis S., Richmond K., Adair D.M., Hugh-Jones M., Kuske C.R., Jackson P. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers // J. Bacteriol., 1997. – Febr. – p. 818-824.

Kim H.U., Goepfert J.M. A sporulation medium for *Bacillus anthracis* // J. Appl. Bacteriol., 1974. – v. 37.

Knaysi G. Structure of the endospore and the cytological processes involved in its formation and germination with remarks on criteria of germination // J. Appl. Bacteriol., 1957. - v.20. - p. 425-430.

Knisely R.F. Selective medium for *Bacillus anthracis* // J. Bact., 1966. - № 92. - p. 784-786.

Kriek N.P.J., V. de Vos Species differences in the pathology of wildlife in the Kruger National Park, South Africa // Salisbury Med. Bul. - 1996 - N87. - P. 82. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Lalitha M.K., Anandi V., Walter N.M., John L., Devadatta J.O., Pulimood B.M., Koshi G. Unusual forms of anthrax - a clinical problem // Salisbury Med. Bul. - 1990 - N68. - P. 38. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

Lalitha M.K. Mathai D., Thomas K., Kumar A., Ganesh A., Jacob M., John T.J. Anthrax - a continuing problem in Southern India. // Salisbury Med. Bul. - 1996 - N87. - P. 14. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Lamarque D., Haessler C., Champion R., Granga D., Bendina, Steinmetz P., Guelina A., Maurice Y. Le charbon au Tchad: une zoonose encore d'actualite // Med. Trop. (Mars.), 1989. - v. 49, N 3. - p. 245-251.

Liang Xudong, Ma Fenggin, Li Aifang Anthrax surveillance and control in China // Salisbury Med. Bul. - 1996 - N87. - P. 16. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Lindeque P.M., Brain C., Turnbull P.C.B. A review of anthrax in the Etosha National Park // Salisbury Med. Bul. - 1996 - N87. - P. 24. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Lindstrom T. // J. Colloid Interf. Sci., 1976. - v. 55. - p. 69-72.

Lorez I., Wong B., Freese E. Bacterial sporulation is not under the same control as catabolite repression of enzymes // Abstrs. 79 th. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol. / Los Angeles, Calif., 1979 / Washington D.C., 1979. - p. 111.

Oh H.B., Park K.S., Park K.D. Serological detection of human anthrax in Korean outbreaks 1992-1995 // Salisbury Med. Bul. - 1996 - N87. - P. 19. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Manchee R.J., Broster M.G., Stagg A.J., Hibbs S.E., Patience B. Out of Gruinard Island // Salisbury Med. Bul. - 1990 - N68. - P. 17. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

275
Powel
sporulating
661-668.
Przyby
Mierzejew
century
non-capsu
N87. - P.
Sept. 19-
Pugh
Salisbury
Anthrax,
Puzis
influen
in chemi
482.
Redm
serology
Med. Bu
Winches
Roth
and age
globigii
Shly
diagnosi
Med. Bu
Winches
Shly
bacteria
53., N 1.
Step
and chr
inside a
N87. -
Sept. 19
Step
chromos
mice an
86. Proc
1995.

Powell J.F., Strang R.E. Biochemical changes occurring during sporulation in *Bacillus* species // *Biochem. J.*, 1956. – v. 63. – p. 661-668.

Przybyszewska M., Matras J., Gorecka M., Knap J., Bartoszcze M., Mierzejewski J. Dermal anthrax, probably originating from a XVth century goat leather "cordovan" and apparently attributable to a non-capsulating *Bacillus anthracis* // *Salisbury Med. Bul.* – 1996 – N87. – P. 21. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Pugh A.O., Davies J.C.A. Human anthrax in Zimbabwe // *Salisbury Med. Bul.* – 1990 – N68. – P.32. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

Puziss M., Wright G.C. Studies on immunity in anthrax. IV. Factor influencing elaboration of the protective antigen of *Bacillus anthracis* in chemically defined media // *J. Bacteriol.*, 1954. – v.68. – p. 471-482.

Redmond C., Hall G.A., Green M., Turnbull P.C.B. Bacteriology, serology and pathology of experimental anthrax in pigs // *Salisbury Med. Bul.* – 1996 – N87. – P. 80. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Roth N.G., Lively D.H., Hodge H.M. Influence of oxygen uptake and age of culture on sporulation of *Bacillus anthracis* and *Bacillus globigii* // *J. Bacteriol.*, 1955. – N 4. – p. 455-459.

Shlyakhov E. Anthraxin – a skin test for early and retrospective diagnosis of anthrax and anthrax vaccination assessment // *Salisbury Med. Bul.* – 1996. – N87. – P. 109. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Shlyakhov E., Rubinstein E. Diagnostic retrospectif du charbon bacterien par intradermoreaction // *Med. Trop. (Fr.)*, 1993. – v. 53., N 1. – p. 55-59.

Stepanov A.S., Leppla S.H. Macrophages are killed by the plasmid and chromosomally encoded factors synthesized by *Bacillus anthracis* inside and outside the host cell // *Salisbury Med. Bul.* – 1996. – N87. – P.89. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Stepanov A.S., Mikshis N.I., Bolotnikova M.F. Role of chromosomally-encoded factors in virulence of *Bacillus anthracis* for mice and guinea pigs // *Salisbury Med. Bul.* – 1996. – N87. – P. 86. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Stepanov A.S., Klimpel K.R., Leppla S.H. Extracellular proteases in *Bacillus anthracis* // Salisbury Med. Bul. – 1996. – N87. P. 87. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Sumerkan B., Aygen B., Doganay M., Sehman E. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis* against macrolides // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 138. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995.

Takahashi Y. Etude sur la variabilite de *B. Anthracis* a partir de germes isoles au micromanipulateur // Ann. Inst. Pasteur, 1939. – v. 62, N 4. – p. 407-446.

Thorne C.B., Gomez C.G., Blind G.P., Housewright R.D. Synthesis of glutamic acid and glutamyl polypeptide by *Bacillus anthracis*. III. Factors affecting peptide production in syntetic liquid media // J. Bacteriol., 1953. – v. 65. – p. 472.

Turnbull P.C.B., Buhm R., Chizuka H.G.B., Tujikura T., Hugh-Jones M., Melling J. Guidelines for the surveillance and control of anthrax in humans and animals // WHO/ZOON, 1993. – N93. – P.170.

Turnbull P.C.B., Bowen J.E., Gillgan J.S., Barrett N.J. Incidence of anthrax and environmental detection of *Bacillus anthracis* in the UK // Salisbury Med. Bul. – 1996 – N87. – P. 5. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Sept. 19-21, 1995

Turnbull P.C.B., Stuart F.A., Barrett N.J., Melling J. Anthrax in the UK // Salisbury Med. Bul. – 1990 – N68. – P. 4. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

Ucida I., Sekizaki T., Hasimoto K. et al. Association of the encapsulation of *Bacillus anthracis* with a 60 megadalton plasmid // J. Gen. Microbiol., 1985. – v. 131. – p. 363-367.

Vodkin M.H., Leppla S.H. Cloning of the protective antigen of *Bacillus anthracis* // Cell., 1983. – v. 34, N 2.

Watson S., Manchee R.J. Spore coat proteins of *Bacillus anthracis* // Salisbury Med. Bul. – 1990 – N68. – P.102. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

Whitford H.W. Incidence of anthrax in the USA: 1945-1988 // Salisbury Med. Bul. – 1990 – N68. – P.5. Proc. Int. Workshop on Anthrax, Winchester, England, Apr. 11-13, 1989.

Wright G.G., Hedberg M.A., Slein J.B. Studies on immunity in anthrax. III. Elaboration of protective antigen in a chemically-defined non-protein medium // J. Immunol., 1954. – v. 72, N 4. – p. 263-269.

roteases
P. 87.
19-21,

icrobial
alisbury
anthrax,

partir de
1939. -

ynthesis
acis. III.
a // J.

, Hugh-
ontrol of
- N93. -

ncidence
is in the
Workshop

anthrax in
Proc. Int.
9.

n of the
smid //

ntigen of

anthracis
Workshop

-1988 //
orkshop on

munity in
lly-difined
p. 263-269.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Аллерген - 82, 133, 162
Антибиотикотерапия -
164, 166, 167, 169
Антракс
- бизонов в Канаде - 23, 24, 122
- диких животных в

Национальных парках
Африки - 32, 35, 36, 38, 39, 81, 83, 121
- на острове Грюнард
в Великобритании - 46
Антраксин - 82
Антраксин-кожный тест - 130

Б

Бактериофаги - 55, 120, 141

В

Вакцинация
- групповая - 229, 234
- безыгольный метод -
188, 229, 233
- диких животных - 236
Вакцина универсальная - 188

Вакцины ветеринарные -
175, 176
- ассоциированные -
55, 192, 194, 195
- свойства:
- биологические - 225
- иммуногенные - 226
Вакцины для людей - 183, 186

Г

Геномная дактилоскопия -
134, 145, 147, 157

Глобулин - 162

Д

Дезинфекция мехового
сырья - 238
Диагноз - 61, 63, 78, 121, 125, 129,
133, 134

Дикие животные - 8, 17, 23, 24,
32, 33, 66, 79, 85, 121, 236
ДНК-ДНК гибридизация -
85, 87, 143

Е

ELISA - 36, 131, 137, 138, 179

И

Идентификация возбудителя

- 86, 133

Иммунитет - 173

Инцидентность - 10, 21, 22, 26,

37, 48, 64, 66

Индикация возбудителя - 158

Инкубационный период - 127,

168

Источник возбудителя
инфекции - 18, 35, 168

К

Капсула - 86, 88

Карантин - 248, 252

Кадастр - 60, 63

Контроль вакцинного
материала - 221

Л

Лектины - 133, 135

Лечение

- животных - 162, 170

- людей - 123, 163, 167

М

Международные

организации - 11, 254

Мероприятия

в эпизоотическом очаге - 248

Мероприятия

по профилактике

- заболеваний сибирской
язвой животных - 244

- заболеваний людей - 246

Мероприятия при

заболевании животных

сибирской язвой - 247

Мероприятия при

заболевании людей

сибирской язвой - 250

Мероприятия при

обнаружении сибирской язвы

на мясоперерабатывающих

предприятиях - 252

Методы вакцинации

- безыгольный - 188, 229, 233

- диких животных - 236

Методы диагностики

- генотипические - 116, 117, 134,
142

- молекулярной

гибридизации - 99, 134, 142, 143

- определения длин

рестриктазных

фрагментов - 144

- полимеразная цепная

реакция - 86, 117, 119, 134, 142, 146,
148, 156-159- рестрикционный анализ - 99,
117, 134, 142, 157

- фенотипические - 116, 159

Н

Напряженность
эпизоотической
ситуации - 11

Неблагополучные пункты - 58,
60, 61, 63, 65, 66, 82, 244

О

Обнаружение возбудителя
- в объектах внешней среды
- 46, 138, 146, 148, 156, 158
- в сырье животного
происхождения - 146

Обеззараживание
- сточных вод - 240
- трупов животных - 239
Очаг эпизоотический - 8, 14, 23,
30, 38, 40, 43, 49, 51, 60, 61, 126, 162, 248

П

Патогенез - 113
Патологические изменения -
68, 109, 121, 122
Периодичность эпизоотий - 43,
83

Питательные среды для
культивирования
возбудителя - 138
Прайминг - 106
Протективный антиген - 21, 36,
79, 82, 95, 108, 110, 138, 173, 212, 228
Профилактика - 63, 84, 244
ПДАФ - 35, 117, 150, 152

Р

Реактор для
культивирования
возбудителя - 213

Реакция непрямо́й
гемагглютинации (РНГА) -
55, 135, 137, 142, 193

С

Сезонность - 13, 16, 18, 20, 21, 24,
27, 30, 35, 41, 43-46, 49, 51, 61, 83
Сибирская язва северных
олений в России - 53, 66
Споры
- зрелые - 90

- концентрирование - 216
- стационарность - 82
- образование - 89
- прорастание - 92
- состав - 90
- устойчивость - 91

Т

Течение болезни

- атипичное - 36
- острое - 130, 227
- подострое - 17, 233

- латентное - 24, 122

- хроническое - 63, 84, 244

Типирование штаммов - 116-118, 148

Токсин - 86, 88, 94, 97, 102

У

Условия культивирования
возбудителя в реакторах - 210,

213, 218, 220

- аэрация - 207, 208

Установка по

обеззараживанию сточных
вод - 240

Ф

Фагоцитоз - 88, 110

Факторы распространения
(передачи) возбудителя - 18,

26, 32, 35, 39, 41, 80, 86, 168

Форма болезни

- кишечная - 16, 18, 21, 82, 122, 167,
169

- кожная - 16-18, 44, 82, 122, 127,
167, 169, 238

- респираторная - 44, 82, 122, 169,
238

Э

Эволюция бацилл - 76

Экзоспора - 93

Экзотоксин - 94, 95, 114

Экспрессия - 180, 181, 183

Эндоспора - 94

Энзоотия - 9, 11, 16, 18, 26, 27, 32,
43, 49, 84

Эпизоотия - 9, 11, 13, 15-17, 24, 27,
29, 32, 33, 38-41, 43, 53, 66, 84, 85, 151

Эпидемия - 53, 152, 169

О Г Л А В Л Е Н И Е

ПРЕДИСЛОВИЕ	4
1. ВВЕДЕНИЕ	5
2. ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ТЕЧЕНИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА) ЖИВОТНЫХ И ЛЮДЕЙ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ	8
2.1. Распространенность (география) сибирской язвы (антракса). Современная эпизоотическая ситуация	8
2.2. Особенности эпизоотологии и эпидемиологии сибирской язвы (антракса) в мире и, в частности, в России в современных условиях	70
Восприимчивые животные (75). Источники возбудителя инфекции и факторы его передачи (80). Стационарность сибирской язвы (антракса) (82). Периодичность (повторяемость) вспышек сибирской язвы (антракса). Сезонность болезни (83). Характеристика эпизоотического процесса сибирской язвы (антракса) в современных условиях (84).	
3. BAC. ANTHRACIS – ВОЗБУДИТЕЛЬ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЖИВОТНЫХ И ЛЮДЕЙ	85
3.1. Классификация и таксономия	85
3.2. Морфология	87
3.3. Изучение сибиреязвенного (антракс) токсина	94
Биохимическая характеристика сибиреязвенного (антракс) токсина (96). Молекулярно-генетическая характеристика сибиреязвенного (антракс) токсина (97). Механизм действия сибиреязвенного (антракс) токсина (102)	
4. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ И ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ	121
5. НОВЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА) И ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БОЛЕЗНИ	129
6. НОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА) У ЖИВОТНЫХ И ЛЮДЕЙ	162
7. ВОПРОСЫ ИММУНОЛОГИИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (АНТРАКСА), НОВЫЕ СРЕДСТВА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ	173

8. НОР
И ПРИ
ПРОФ
8.1. Ос
вакцин
8.2. И
для по
8.3. К
сибире
8.4. У
вакцин
8.5. И
вакцин
8.6. Г
9. СО
ПРОФ
(ПРО
И ПРО
СПИС
ПРЕД

8. НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА И ПРИМЕНЕНИЯ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ	202
8.1. Особенности культивирования сибиреязвенных вакцинных штаммов	202
8.2. Использование суспензионного культивирования для получения спорового вакцинного материала	213
8.3. Концентрирование спор вакцинного сибиреязвенного штамма	216
8.4. Усовершенствованные методы контроля спорового вакцинного материала	221
8.5. Иммунобиологические свойства сибиреязвенной вакцины, изготовленной суспензионным способом	225
8.6. Групповое применение сибиреязвенной вакцины	229
9. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ И ВЫНУЖДЕННЫХ (ПРОТИВОЭПИЗООТИЧЕСКИХ И ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ) МЕРОПРИЯТИЙ	235
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	256
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	278

БАКУЛОВ И.А., ГАВРИЛОВ В.А., СЕЛИВЕРСТОВ В.В.
**СИБИРСКАЯ ЯЗВА (АНТРАКС);
НОВЫЕ СТРАНИЦЫ В ИЗУЧЕНИИ
«СТАРОЙ» БОЛЕЗНИ**

Ответственный за выпуск В. Машковцев
Редактор и корректор Н. Будникова
Компьютерная верстка: С. Сухарев, Т. Власова

Сдано в набор 10.11.2000
Подписано в печать 25.01.2001
Формат 84х108/32. Печать высокая.
Усл. п. л. 20. Тираж 5000 экз. Зак. № 983

Издательство «Посад»
Лицензия ЛР № 071622 от 09.04.98 г.
600015, г. Владимир, пр-т Ленина, 22
Тел. (0922) 24-47-65.

ГП Владимирская книжная типография
600000, г. Владимир, Октябрьский проспект, д. 7
Качество печати соответствует
качеству представленных диапозитивов.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

OK

Ран.

И. А. БАНУЛОВ
В. А. ГАВРИЛОВ
В. В. СЕЛИВЕРСТОВ